

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

**Fluoreszenzspektroskopische und biochemische Charakterisierung
der Protein-Protein Wechselwirkungen von CFP- und YFP-
Fusionsproteinvarianten peroxisomaler Membranproteine**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Geiger
aus Erding
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Ania C. Muntau

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Veit Gülberg

Priv. Doz. Dr. Gerald Denk

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

31.01.2013

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

VI

ZUSAMMENFASSUNG

IX

1. EINLEITUNG

1

1.1. Peroxisomen - Historischer Überblick	1
1.2. Morphologie der Peroxisomen	1
1.3. Peroxisomale Stoffwechselfunktionen	2
1.4. Peroxisomale Erkrankungen beim Menschen	3
1.5. Modelle zur Biogenese von Peroxisomen	4
1.6. Matrixproteinimport in Peroxisomen	10
1.6.1. Signalsequenzen PTS1 und PTS2	10
1.6.2. Rezeptoren	11
1.6.3. Peroxisomales Docking, Translokation und Rezeptor Recycling	13
1.7. Biosynthese peroxisomaler Membranen	15
1.8. Peroxisomale ABC-Transporter	17
1.9. Die Verwendung von GFP-Fusionsproteinen als Hilfsmittel bei der Charakterisierung peroxisomaler Protein-Protein Wechselwirkungen	20
1.10. Zielsetzung der Arbeit	21

2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. Materialien und Geräte	23
2.1.1. Chemikalien	23
2.1.2. Puffer und Lösungen	23
2.1.3. Bakterienstämme	24
2.1.4. Anzuchtmedien	24
2.1.5. Eukaryotische Zelllinien	24
2.1.6. Medien, Puffer und Antibiotika für die eukaryotische Zellkultur	25
2.1.7. Enzyme	25
2.1.8. Eingesetzte Materialien für die DNA-Sequenzierung	25
2.1.9. Affinitäts-Säulen und -Matrices	26
2.1.10. Längen- und Molekulargewichtsstandards	26
2.1.11. Reagenzien für die horizontale gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	27
2.1.12. Antikörper, sekundäre Antikörper und Nachweisreagenzien	27
2.1.13. Transfektionsreagenzien und -material	29
2.1.14. Reagenzien für Immunpräzipitation	29
2.1.15. Reagenzien für die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektro- phorese (PAGE) von Proteinen	30
2.1.16. Materialien für Westernblot und Immundetektion	31
2.1.17. Membranen und Blottingpapier	32
2.1.18. Vektoren und Plasmide	32
2.1.19. Verbrauchsmaterialien und spezielle Geräte	35
2.2. Methoden	36

2.2.1. Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1.1. Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	36
2.2.1.2. <i>Escherichia coli</i> Dauerkulturen	36
2.2.1.3. Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	36
2.2.1.4. Isolierung von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i> -Zellen	37
2.2.1.5. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	38
2.2.1.6. Horizontale Gelelektrophorese im Agarosegel	38
2.2.1.7. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
2.2.1.8. Sequenzierung von DNA	41
2.2.2. Zellbiologische Methoden	43
2.2.2.1. Zellkultur	43
2.2.2.2. Generationswechsel der Zellen	44
2.2.2.3. Vorbereitung der Zellen für Magnetofektionsversuche	44
2.2.2.4. Magnetofektion	45
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.3.1. Immunpräzipitation	46
2.2.3.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	47
2.2.3.3. Westernblot	48
2.2.3.4. Immundetektion von Proteinen	49
2.2.4. Fluoreszenz-spektroskopische Methoden	51
2.2.4.1. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)	51
2.2.4.2. Fluoreszenzmikroskopie	53

3. ERGEBNISSE 54

3.1. Untersuchungen zur Homo- und Heterodimerisierung der peroxisomalen ABC-Halbtransporter ABCD4 und ABCD1	54
3.1.1. Homodimerisierung ABCD1-ABCD1	55

3.1.2. Negativkontrolle YFP mit ABCD1-HA/ABCD4-HA	57
3.1.3. Homodimerisierung ABCD4-ABCD4	58
3.1.4. Heterodimerisierung ABCD1-ABCD4	60
3.2. Charakterisierung der Interaktion von PEX19 mit dem peroxisomalen Membranprotein PEX26	63
3.2.1. Biochemische Untersuchungen zur Interaktion von PEX19 und PEX26	63
3.2.2. Untersuchungen zur Interaktion von PEX26 mit verschiedenen PEX19-Domänen mittels fluorescence resonance energy transfer (FRET)	65
3.2.3. Eingrenzung des PEX19-Interaktionsbereichs von PEX26 mittels FRET	71
3.3. Suche nach Interaktionspartnern für das Peroxin PEX3	72
4. DISKUSSION	77
4.1. Homo- und Heterodimerisierung von ABCD4	77
4.1.1. Zusammenhang zwischen ABCD1-ABCD4 Heterodimerisierung und ALD-Phänotypen	78
4.1.2. Bedeutung von ABCD4 als mögliches <i>Modifier</i> -Gen	81
4.2. Interaktion des Peroxins PEX19 mit dem peroxisomalen Membranprotein PEX26	83
4.2.1. Die Domäne D2 von PEX19 interagiert mit PEX26	84
4.2.2. Zwei PEX19-Bindemotive in PEX26	86
4.3. TBX3, ein neuer potentieller Interaktionspartner von PEX3	88
4.3.1. Steuerung der peroxisomalen Biogenese durch PEX3 und seine Interaktionspartner	89
4.3.2. Steuerung der Tumorsuppression durch TBX3 und seiner Interaktion mit peroxisomalen Proteinen	91
4.3.3. Ausblick: Die Rolle von Peroxinen bei anderen nicht-peroxisomalen zellulären Prozessen	92

ABKÜRZUNGEN

A

Adol-CALD	adolescent cerebral ALD
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDP	Adrenoleukodystrophie-Protein
AK	Antikörper
AMN	Adrenomyeloneuropathie
AMN-C	AMN mit zerebraler Demyelinisierung
aa	amino acid (Aminosäure)
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>

B

Bp	Basenpaare
----	------------

C

<i>Ce</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C	Cytosin
CCALD	childhood cerebral ALD
cDNA	komplementäre DNA

D

DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum

F

FRET fluorescence resonance energy transfer

G

GFP Grün fluoreszierendes Protein

H

Hs *Homo sapiens*

I

IgG Immunglobulin G

IMP Integrales Membranprotein

IRD Infantile Refsum'sche Erkrankung

K

Kb Kilobasen

kDa Kilodalton

M

min Minute(n)

mRNA messenger-RNA

N

Nc *Neurospora crassa*

NALD Neonatale Adrenoleukodystrophie

nm Nanometer

P

PBD peroxisome biogenesis disorder

PBS Phosphate-Buffered-Saline

PCR Polymerasekettenreaktion

PEX Bezeichnung von Peroxin-kodierenden Genen

PTS peroxisomal targeting signal

PTS1 peroxisomal targeting signal 1

PTS2 peroxisomal targeting signal 2

R

RCDP rhizomelische Chondrodysplasia punctata

RNA Ribonukleinsäure

S

Sc *Saccharomyces cerevisiae*

SDS Natriumdodecylsulfat

SH3 Src homology 3

SNP single nucleotide polymorphism

T

Tb *Trypanosoma brucei*

TBE-Puffer Tris-Borsäure-EDTA-Puffer

TE-Puffer Tris-EDTA-Puffer

Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

V

VLCFA very long chain fatty acids (überlangkettige Fettsäuren)

VLCS very long-chain acyl-CoA-Synthetase

X

X-ALD X-chromosomal gebundene Adrenoleukodystrophie

Y

Yl *Yarrowia lipolytica*

Z

ZNS Zentrales Nervensystem

ZS Zellweger-Syndrom

Im Rahmen dieser Arbeit wurden biochemische bzw. fluoreszenzspektroskopische Methoden etabliert und eingesetzt, um neue Erkenntnisse über die Protein-Protein Wechselwirkungen peroxisomaler Membranproteine zu generieren. Hierzu wurden Fusionsproteinvarianten peroxisomaler Membranproteine verwendet, welche am N- oder C-Terminus mit Varianten des green fluorescent protein (GFP), fusioniert waren. Die Verwendung solcher cyan fluorescent protein (CFP) oder yellow fluorescent protein (YFP) Fusionsproteine bringt den Vorteil, dass diese sowohl biochemisch als auch fluoreszenzspektroskopisch *in vivo* und *in vitro* untersucht werden können.

Mit dieser Methodik wurde zunächst biochemisch die bereits bekannte Homodimerisierung des peroxisomalen ABC-Halbtransporters ABCD1 erfolgreich nachgewiesen. Dabei konnte belegt werden, dass die relativ großen CFP- bzw. YFP-Fusionsproteinanteile eine Bindung zwischen ABCD1 Proteinen sterisch nicht behindern. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der peroxisomale ABC-Halbtransporter ABCD4 Homodimere mit sich selbst bzw. Heterodimere mit ABCD1 bildet. Letztere neu entdeckte Proteinwechselwirkung ist von besonderer Bedeutung, da sich dadurch potentiell neue Therapieansätze für die schwere Stoffwechselerkrankung Adrenoleukodystrophie eröffnen, welche durch einen Defekt im *ABCD1*-Gen verursacht wird.

In einem weiteren Schritt wurde die Interaktion zweier peroxisomaler Biogeneseproteine, den Peroxinen PEX19 und PEX26, biochemisch und fluoreszenzspektroskopisch mittels fluorescence resonance energy transfer (FRET) näher charakterisiert. Der Interaktionsbereich beider Proteine konnte auf aa242-270 von PEX26 und auf Domäne 2 von PEX19 eingegrenzt werden. Da dieser Bereich von PEX26 auch allein für das Targeting von PEX26 zum Peroxisom ausreichend ist, hat die Eingrenzung dieser Protein-Protein Interaktion auch Auswirkungen auf das nähere Verständnis der Erkennung und anschließenden Bindung von Kargoproteinen an den peroxisomalen Membranproteinrezeptor PEX19.

Schließlich konnte mit Hilfe eines YFP-PEX3 Fusionsproteins TBX3 als ein neuer potentieller Interaktionspartner des peroxisomalen Membranproteins PEX3 identifiziert werden. Da eine Protein-Protein Wechselwirkung von TBX3 mit einem anderen Peroxin (PEX19) in der Maus schon beschrieben wurde, stützt diese neu gefundene PEX3-TBX3-Proteinwechselwirkung, dass die peroxisomale Biogenese mit anderen bedeutenden zellulären Prozessen wie Apoptose bzw. Tumorsuppression verknüpft ist.

1. EINLEITUNG

1.1. PEROXISOMEN – HISTORISCHER ÜBERBLICK

Als winzige Körperchen, sogenannte „microbodies“ wurden die Peroxisomen Mitte der fünfziger Jahre von ihren Entdeckern bezeichnet. Die Zugehörigkeit zur Organellenfamilie der „microbodies“ verdanken die Peroxisomen zusammen mit den Glyoxisomen höherer Pflanzen (Breidenbach & Beevers, 1967) und den Glykosomen der Trypanosomen (Opperdoes & Borst, 1977) ihrer Morphologie und ihren Sedimentationseigenschaften in der Ultrazentrifugation.

Im Gegensatz zu anderen Zellorganellen, wie Mitochondrien oder Chloroplasten, wurden die Peroxisomen erst relativ spät beschrieben und erstmals mit Hilfe des Elektronenmikroskops im Jahre 1954 durch Rhodin identifiziert (Rhodin, 1954).

Ihren heutigen Namen erhielten die Peroxisomen 1965 durch den belgischen Biochemiker Christian de Duve. Ihm gelang es, in den Peroxisomen der Rattenleber neben H_2O_2 produzierenden Oxidasen den Umsatz von Wasserstoffperoxid durch das Enzym Katalase nachzuweisen, und erkannte somit deren Bedeutung und Funktion im Zellstoffwechsel (DeDuve & Baudhuin, 1966).

In den sechziger Jahren entwickelten Fahimi, sowie Novikoff und Goldfischer spezielle Färbemethoden (Fahimi, 1969; Novikoff & Goldfischer, 1969), um die Katalase mittels Licht- und Elektronenmikroskopie in Peroxisomen schnell und einfach nachzuweisen.

Die systematische Anwendung dieser Methoden zeigte, dass Peroxisomen als unerlässliche Bestandteile jeder Zelle anzusehen sind.

1.2. MORPHOLOGIE DER PEROXISOMEN

Peroxisomen sind vesikuläre 0,2-1,0 μm große Zellorganellen, die ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen außer reifen Erythrozyten vorkommen (Corpas *et al.*, 2001). Es handelt sich dabei um runde bis ovale Vesikel, die teilweise auch komplexere Formen annehmen können, so dass neben länglichen, röhren- und spiralförmigen auch retikuläre Formen beschrieben wurden (Gorgas, 1984; Schrader *et al.*, 2000). Größe, Form und Anzahl der Peroxisomen sind dabei gewebs- bzw. zellspezi-

fisch. In humanen Zellen variiert die Peroxisomenzahl zwischen 100 und mehreren 1000 Stück je Zelltyp (Veenhuis & Harder, 1988).

Das Innere der Peroxisomen besteht aus einer elektronendichten und proteinreichen Matrix mit einer geschätzten intraperoxisomalen Proteinkonzentration von 200 - 300 µg/ml (Gould *et al.*, 1995).

In einzelnen Peroxisomen können die Proteine dabei eine so hohe Konzentration erreichen, dass diese die Tendenz zur Kristallisation zeigen. Der Nachweis der Kristalle eignet sich aber nicht zur Identifikation der Zellorganellen, da diese in den meisten Peroxisomen fehlen. Verschiedene Studien mit humanen Hautfibroblasten konnten eine alkalische peroxisomale Matrix mit einem mittleren pH-Wert von 8,3 nachweisen. Diese Matrix wird von einer singulären peroxisomalen Lipidmembran begrenzt, welche, wie jede biologische Membran, eine Impermeabilität für Moleküle, wie z.B. NAD⁺, Acetyl-CoA, sowie NADP⁺ und Proteine aufweist (Gould *et al.*, 1995).

1.3. PEROXISOMALE STOFFWECHSELFUNKTIONEN

Peroxisomen beherbergen eine Vielzahl von metabolischen Prozessen, die spezies-, gewebe-, oder zellspezifisch variieren können. Diese Stoffwechselfunktionen werden durch peroxisomale Enzyme in der Matrix und durch metabolische Transporter und Enzyme in der peroxisomalen Membran vermittelt.

Die Anzahl, das Volumen, der Proteingehalt und die biochemischen Funktionen von Peroxisomen können in Abhängigkeit der Substratzufuhr reguliert werden und ermöglichen somit eine flexible Anpassung des Zellstoffwechsels (Nunnari & Walter, 1996).

Humane Peroxisomen verfügen über ein komplettes β-Oxidationssystem für Fettsäuren (Kunau *et al.*, 1988) das im Unterschied zur mitochondrialen β-Oxidation (Hashimoto, 1982) auch die β-Oxidation überlangkettiger Fettsäuren (**Very Long Chain Fatty Acids**, VLCFA) ermöglicht (Steinberg *et al.* 1999; Wanders *et al.*, 2010). Des Weiteren sind sie essentiell für die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin durch die β-oxidative Spaltung von Seitenketten (Pedersen & Gustafsson, 1980), die Synthese von Cholesterin und anderen Isoprenoiden (Krisans, 1992). Auch der Prostaglandin-Stoffwechsel (Schepers *et al.*, 1988) kann als metabolische Funktion der Peroxisomen gesehen werden. Außerdem liegt eine Beteiligung der Peroxisomen an der Oxalatsynthese (DeDuve & Baudhuin, 1966; Noguchi & Takada, 1979) und Gluconeogenese aus Aminosäuren vor (Noguchi & Takada, 1978; Noguchi & Takada, 1979). In Pflanzenzellen zeigen die Peroxisomen im Glyoxylatzyklus eine Beteiligung an der Pho-

torespiration (Breidenbach & Beevers, 1967) und bei einigen niederen Pilzen an der Penicillinbiosynthese (Müller *et al.*, 1992).

1.4. PEROXISOMALE ERKRANKUNGEN BEIM MENSCHEN

Störungen in Struktur und Funktion der Peroxisomen sind verantwortlich für schwerwiegende Krankheitsbilder, welche häufig mit letalem Ausgang einhergehen. So erkannte Goldfischer als erster den Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Zellweger-Syndroms (Bowen *et al.*, 1964) und dem Fehlen von Peroxisomen. Die peroxisomalen Erkrankungen können nach biochemischen und morphologischen Kriterien in drei Gruppen eingeteilt werden (Lazarow, 1995; Wanders *et al.*, 1988a).

Zur ersten Gruppe zählen alle Erkrankungen, die mit einem vollständigen peroxisomalen Funktionsverlust einhergehen. Dazu gehören das bereits oben genannte Zellweger-Syndrom (ZS), die infantile Refsumsche Erkrankung (IRD) und die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD). Während beim ZS der Tod meist innerhalb der ersten Lebensmonate eintritt, kann bei milderer Formen der IRD durchaus das Erwachsenenalter erreicht werden. Charakteristisch für diese Gruppe sind schwere neurologische und hepatische Dysfunktionen, craniofaziale Auffälligkeiten und ein verminderter Muskeltonus. Biochemisch kommt es bei diesen Patienten zur Akkumulation von Intermediärprodukten der Gallensäuresynthese, überlangkettigen Fettsäuren und Phytansäure im Blut und zu erniedrigten Plasmalogenspiegeln im Gewebe.

Bei der zweiten Gruppe der peroxisomalen Erkrankungen liegt ein partieller Funktionsverlust der Peroxisomen vor, d.h. die Peroxisomen sind zwar morphologisch intakt, eine oder mehrere Funktionen sind jedoch gestört. So ist z.B. bei der rhizomelischen Chondrodysplasia punctata (RCDP) der Import einiger peroxisomaler Matrixproteine nicht möglich, so dass daraus schwere Wachstumsstörungen mit Verkürzung proximaler Extremitäten und geistige Retardierung resultieren. Darüber hinaus leiden Patienten mit RCDP an einer Kalzifikation der Epiphysen, Ichthyose und Cataracta congenita. Aus biochemischer Sicht liegt eine gestörte Phytansäureoxidation und Plasmalogenbiosynthese vor. Im Gegensatz zur ersten Gruppe sind hier die Oxidation der VLCFA und die Gallensäurenbiosynthese einwandfrei möglich.

Die dritte Gruppe erfasst alle Erkrankungen, die mit einem Ausfall einzelner Enzyme oder Proteine verbunden sind. Die Peroxisomen sind hier, wie schon in der zweiten Gruppe, morphologisch intakt. In diese Gruppe einzuordnen sind die Krankheitsbilder der X-chromosomal vererbten Adrenoleuko-

dystrophie (X-ALD), Hyperoxalurie Typ1 (PH1), Actalasämie, sowie Defekte der Acetyl-CoA-Oxidase, des trifunktionellen Enzyms und der peroxisomalen Thiolase.

Bei der X-ALD unterscheidet man verschiedene klinische Verlaufsformen. Eine häufige und schwere klinische Verlaufsform stellt die kindlich-zerebrale ALD (*childhood cerebral* ALD, CCALD) dar. Das durchschnittliche Manifestationalter liegt bei 7 Jahren und ist durch einen raschen Verlauf der neurologischen Symptome gekennzeichnet. Sie tritt in 48% der Fälle auf. In nur 8% der Fälle werden die phänotypischen Varianten der jugendlich-zerebralen ALD (*adolescent cerebral* ALD, AdolCALD) und der erwachsenen-zerebralen ALD (*adult cerebral*, ACALD) beobachtet. Diese beiden Formen unterscheiden sich von der kindlichen Form durch ein späteres Manifestationalter (10-21 Jahre bei AdolCALD und >21 Jahre bei ACALD). Die häufigste Verlaufsform im Erwachsenenalter stellt mit 25% die Adrenomyeloneuropathie (AMN) dar. Das durchschnittliche Manifestationsalter liegt hier bei 27 Jahren (Moser et al., 1995). Bei der AMN kommt es zur Demyelinisierung des Rückenmarks und der peripheren Neurone. Eine besondere Verlaufsform der AMN ist die mit zerebraler Demyelinisierung (AMN-C) (Moser et al., 2001).

1.5. MODELLE ZUR BIOGENESE VON PEROXISOMEN

Ähnlich wie die meisten anderen Zellorganellen wie z.B. der Nucleus, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Reticulum (ER), die Endosomen, die Lysosomen und die Transportvesikel, scheinen die Peroxisomen einen einzigartigen Biogenesemechanismus zu besitzen. Peroxine sind Proteine, die an der peroxisomalen Biogenese beteiligt sind. Sie werden von *PEX*-Genen kodiert. Die spezifische Funktion der einzelnen Peroxine ist bis heute jedoch weitgehend ungeklärt. Eine Übersicht über die beim Menschen und anderen Organismen bekannten Peroxine gibt Tabelle 1. Historisch existieren zwei gegensätzliche Biogenesemodelle:

Im ersten Modell, aufgestellt von Novikoff und Shin (Novikoff & Shin, 1964) sowie von De Duve und Baudhuin (DeDuve & Baudhuin, 1966) wurde postuliert, dass die Peroxisomen durch Abknospung vom Endoplasmatischen Reticulum entstehen. Grundlage dieser These ist die morphologische Nähe der Peroxisomen zum ER. Mitte der neunziger Jahre führte die Auswertung neuer experimentell gewonnener Daten zu der Erkenntnis, dass auch das ER an der Biogenese von Peroxisomen beteiligt sein könnte. Dafür spricht die Tatsache, dass es im ER zu einer Akkumulation peroxisomaler Membranproteine kommt (Titorenko et al., 1997; Titorenko & Rachubinski, 1998). Außerdem konnte eine Bindung von Coatamer an Peroxisomen (Passreiter et al., 1998) und eine Proliferation von Endomembranen durch Überexpression peroxisomaler Membranproteine nachgewiesen werden (Elgers-

ma *et al.*, 1997). Bereits in der Vergangenheit wurden Zusammenhänge zwischen Membrankontinuität und ER vermutet, wobei dieses Modell keine Akzeptanz fand (Novikoff *et al.*, 1972). Diese Erkenntnisse bildeten jedoch zum Teil die Grundlage für spätere Biogenesemodelle (Geuze *et al.*, 2003; Tabak *et al.*, 2003).

Eine davon abweichende Hypothese stellten dagegen Lazarow und Fujiki (Lazarow & Fujiki, 1985) im zweiten Modell auf. Hierbei gingen sie davon aus, dass einige Erkenntnisse gegen eine Beteiligung des ERs an der Biogenese der Peroxisomen sprächen. So erfolgt z.B. die Translation peroxisomaler Proteine an den freien Ribosomen im Zytoplasma. Ein Proteinimport erfolgt erst posttranslational (Lazarow & Fujiki, 1985). Des weiteren weisen Peroxisomen und ER eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung ihrer Membranen auf (Fujiki *et al.*, 1982). Das alternative Modell zur Biogenese von Peroxisomen schlägt daher vor, dass der posttranslationale Import der peroxisomalen Proteine eine Proliferation der Peroxisomen hervorruft. Anschließend kommt es zur Teilung und Ausbildung von Tochterperoxisomen. Eine *de novo*-Synthese von Peroxisomen wäre hiermit ausgeschlossen, so dass jede Zelle von Anfang an mindestens ein Peroxisom enthalten muss (Lazarow & Fujiki, 1985).

Neuere Untersuchungen haben nun gezeigt, dass in der frühen Phase der peroxisomalen Biogenese die Peroxine PEX3 und PEX19 eine bedeutende Rolle spielen. Diese beiden Peroxine konnten zunächst in Subregionen des ERs und später in reifen Peroxisomen nachgewiesen werden. PEX3 fungiert hierbei als membranständiger PEX19-Rezeptor für die Insertion weiterer an PEX19 gebundener PMPs (Hoepfner *et al.*, 2005).

Die Vorstellung von Lazarow und Fujiki bleibt bis heute weitgehend akzeptiert, wurde aber aufgrund neuerer Erkenntnisse modifiziert, so dass sich eine weitere Hypothese (Kunau & Erdmann, 1998) ergab, welche versucht, die beiden Biogenesemodelle miteinander zu verknüpfen.

Die Kombination der beiden Modelle geht davon aus, dass die frühen peroxisomalen Membranproteine PEX3 und PEX19 in die ER-Membran inserieren bzw. an die ER-Membran binden. Nach Insertion weiterer PMPs erfolgt anschließend eine Abschnürung von Vesikeln und der Transport zu peroxisomalen Strukturen. Weitere Membran- und Matrixproteine gelangen entweder direkt oder über einen vesikelvermittelten Transport aus dem Zytoplasma in die Peroxisomen. Die vollständig ausgebildeten Peroxisomen teilen sich dann nach dem Modell von Lazarow und Fujiki. Danach werden Vesikel von den Peroxisomen abgeschnürt und erreichen durch Rücktransport wieder das ER.

Somit kann die Biogenese der Peroxisomen in drei Abschnitte (Brown & Baker, 2003; Kunau & Erdmann, 1998) gegliedert werden:

Der erste Abschnitt beinhaltet die Membranbiogenese mit der Inkorporation von Lipiden und Membranproteinen in die Membran. Dabei spielen mit Sicherheit die Peroxine PEX3 und PEX19 eine entscheidende Rolle. In diesem Fall gelangen aus dem Zytosol sog. Class I PMPs (s. 1.6.1.) in die peroxisomale Membran. Diese These wird durch folgende Beobachtungen gestützt:

Erstens bindet PEX19 neu synthetisierte PMPs an spezifischen Motiven, die für das Targeting benötigt werden. Zweitens erhält PEX19 die PMPs in einem transportfähigen Zustand. Drittens führt eine Überexpression von PEX19 zur Stabilisierung der PMPs im Zytosol. Viertens bindet PEX19 über eine Docking-Domäne an PEX3 und nicht über das Targetingsignal und fünftens findet eine PEX3-PEX19 Interaktion hauptsächlich an der peroxisomalen Membran statt. Class II PMPs enthalten kein Targetingsignal, das an PEX19 bindet, sondern nehmen den Weg über das ER zum Peroxisom (Nuttall et al., 2011).

Im zweiten Abschnitt erfolgt der Import von Matrixproteinen, verbunden mit Reifung und Wachstum des Peroxisoms. Für diesen Vorgang sind die Matrixprotein-Rezeptoren PEX5 und PEX7 und die peroxisomalen Membranproteine PEX1, PEX2, PEX6, PEX10, PEX12, PEX13, PEX14 und PEX26 verantwortlich. Außerdem ermöglichen PEX3, PEX16 und PEX19 den Einbau von weiteren Membranproteinen in die wachsende peroxisomale Membran (Gould & Valle, 2000).

Im dritten Abschnitt findet abschließend die Teilung und Vermehrung von Peroxisomen statt (Schneider et al., 2011).

Mittlerweile ist es einigen Autoren gelungen, zu zeigen, dass auch verschiedene Class I PMPs über das ER die Peroxisomen erreichen (Zand et al., 2010 ; Lam et al., 2010). Damit werden PEX3 und PEX19 neue Rollen zugeschrieben. Diese Peroxine sind somit nicht mehr am peroxisomalen Import beteiligt, sondern am Export ER-ansässiger Proteine. Normalerweise verlassen Proteine das ER mit Hilfe des COPII-Komplexes, eine Ausnahme bilden jedoch die PMPs. In diesem Zusammenhang wurde auch der Dsl1-Komplex entdeckt, dessen Funktion aber noch unklar ist. Die oben beschriebenen Erkenntnisse konnten nur in der Hefe *S. cerevisia* nachgewiesen werden, so dass es sich bei der peroxisomalen Biogenese möglicherweise um einen speziesabhängigen Vorgang handelt (Nuttall et al., 2011).

Peroxin	Organismus	Funktion	Subzelluläre Lokalisation	Interagierende peroxisomale Proteine
PEX1	<i>Hs, Sc, Yl, Nc, Ce, At</i>	Matrixproteinimport PTS-Rezeptor AAA-ATPase	zytosolisch, peroxisomal	PEX6
PEX2	<i>Hs, Sc, Yl, Nc, Ce, At</i>	Matrixproteinimport RING-Finger-Protein PTS-Rezeptorzyklus	integrales PMP	PEX10
PEX3	<i>Hs, Sc, Nc, At</i>	Membranproteinimport Beteiligt an Membranbiogenese Membranrezeptor für PEX19	integrales PMP	PEX19
PEX4	<i>Sc, Nc, At</i>	Membranproteinimport E2-Ubiquitin-konjugiertes Enzym PTS-Rezeptorzyklus	peripheres PMP	PEX22
PEX5	<i>Hs, Sc, Yl, Nc, Ce, At</i>	Matrixproteinimport Rezeptor für PTS1-Proteine	zytosolisch, peroxisomal	PEX7, PEX8, PEX10, PEX12, PEX13, PEX14, DDO, CAT, SCP, AGXT
PEX6	<i>Hs, Sc, Yl, Nc, Ce, At</i>	Matrixproteinimport PTS-Rezeptorzyklus AAA-ATPase	zytosolisch, peroxisomal	PEX1, (Sc)PEX15, (Hs)PEX26
PEX7	<i>Hs, Sc, Nc, At</i>	Matrixproteinimport Rezeptor für PTS2-Proteine	zytosolisch, peroxisomal	PEX5, PEX13, PEX14, PEX18, PEX20, PEX21, PHYH
PEX8	<i>Sc, Yl, Nc</i>	Matrixproteinimport	luminales PMP	PEX5, PEX20
PEX9	<i>Yl</i>	Import der Matrixproteine	integrales PMP	

PEX10	Hs, Sc, Yl, Nc, At	Matrixproteinimport RING-Finger-Protein	integrales PMP	PEX2, PEX5, PEX12, PEX19
PEX11A Pex11B PEX11G	Hs, Sc, Yl, Nc, At	Beteiligt an der Teilung der Peroxisomen, Vererbung und Transport mittelkettiger Fettsäuren	integrales PMP	<u>PEX11A</u> : FIS, DNM1L, PEX11G <u>PEX11B</u> : PEX19, FIS1, DNM1-L, PEX11G <u>PEX11G</u> : PEX11B, FIS1, DNM1-L, PEX11A
PEX12	Hs, Sc, Nc, Ce, At	Matrixproteinimport PTS-Rezeptorzyklus	integrales PMP	PEX5, PEX10, PEX19
PEX13	Hs, Sc, Nc, Ce, At	SH3-Protein; Import der Matrixproteine, beteiligt am Rezeptor-Docking mit Pex14p	integrales PMP	PEX5, PEX7, PEX14, PEX19
PEX14	Hs, Sc, Yl, Nc, At	Matrixproteinimport Initiationsstelle für das Rezeptor-Docking	PMP	PEX5, PEX7, PEX13, PEX17, PEX19
PEX15	Sc	Import der Matrixproteine, Membranrezeptor für Pex6	integrales PMP	PEX6
PEX16	Hs, Yl, Nc, At	Membranproteinimport Peroxisomale Biogenese	integrales PMP	PEX19
PEX17	Sc	Matrixproteinimport Komponente des Dockingkomplexes	peripheres PMP	PEX14, PEX19
PEX18	Sc	Matrixproteinimport Importkokaktor für PTS2-Proteine	zytosolisch, peroxisomal	PEX7
PEX19	Hs, Sc, Yl, Nc, Ce	Matrixproteinimport zytosolischer PMP-Rezeptor Chaperon	zytosolisch, peroxisomal	PEX3, PEX10, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX17, PEX26, PXMP4, SLC25A17, ABCD1, ABCD2, ABCD3

PEX20	Yl, Nc	Matrixproteinimport Importkokaktor für PTS2-Proteine	zytosolisch, peroxisomal	PEX7, PEX8
PEX21	Sc	Matrixproteinimport Importkokaktor für PTS2-Proteine	zytosolisch, peroxisomal	PEX7, PEX13, PEX14
PEX22	Sc, At	Matrixproteinimport Membrananker für Pex4p	integrales PMP	PEX4
PEX23	Yl, Nc	Matrixproteinimport	integrales PMP	
PEX24	Yl	Matrixproteinimport	integrales PMP	
PEX25	Sc	Regulierung der Peroxisomenzahl- und -größe	peripheres PMP	PEX27
PEX26	Hs	Import der Matrixproteine rekrutiert PEX1-PEX6-Komplex an der peroxisomalen Membran	integrales PMP	PEX6, PEX19
PEX27	Sc	Kontrolliert Peroxisomenzahl- und -größe	peripheres PMP	PEX25
PEX28	Yl	Regulierung der Peroxisomenzahl- und -größe	integrales PMP	
PEX29	Yl	Regulierung der Peroxisomenzahl- und -größe	integrales PMP	
PEX30	Sc	Kontrolliert Peroxisomengröße und -Vererbung	integrales PMP	PEX28, PEX29, PEX31, PEX32
PEX31	Sc	Kontrolliert Peroxisomengröße und -Vererbung	integrales PMP	PEX28, PEX29, PEX30, PEX32

PEX32	Sc	Kontrolliert Peroxisomengröße und -Vererbung	integrales PMP	PEX28, PEX29, PEX30, PEX31
-------	----	--	----------------	----------------------------

Tab. 1: Übersicht der Peroxine (nach Wanders & Waterham, 2005 und HRPD)

At: *Arabidopsis thaliana*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Hs: *Homo sapiens*; Nc: *Neurospora crassa*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Yl: *Yarrowia lipolytica*

1.6. MATRIXPROTEINIMPORT IN DAS PEROXISOM

Die Translation peroxisomaler Proteine erfolgt an den freien Poly-Ribosomen im Zytoplasma. Matrixproteine werden dann zur peroxisomalen Membran und anschließend durch diese in das Innere der Peroxisomen transportiert. Für diesen gerichteten Transport müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein.

Die erste wichtige Voraussetzung ist, dass die zu transportierenden Proteine bestimmte Signalsequenzen aufweisen müssen, welche diese als „peroxisomal“ markieren. Zweites müssen diese Signalsequenzen von entsprechenden Rezeptoren erkannt werden und die Proteine anschließend mit Hilfe dieser Rezeptoren zur peroxisomalen Membran transportiert werden. Als dritte Voraussetzung muss eine Importmaschinerie existieren, welche die peroxisomalen Matrixproteine durch die peroxisomale Membran in die peroxisomale Matrix transportiert.

1.6.1. SIGNALSEQUENZEN PTS1 UND PTS2

Es gibt zwei Signalsequenzen, die für den gezielten Transport peroxisomaler Matrixproteine verantwortlich sind. Es handelt sich dabei um die peroxisomalen Targetingsignale PTS1 und PTS2.

PTS1 setzt sich aus einer Sequenz von drei Aminosäuren zusammen und ist am C-Terminus zahlreicher Matrixproteine lokalisiert. PTS1 wurde erstmals in den Luziferase-Proteinen des Leuchtkäfers nachgewiesen (Gould *et al.*, 1987). In der Folge konnte in zahlreichen Organismen die Existenz von Matrixproteinen bewiesen werden, die eine von der ursprünglichen Aminosäuresequenz Serin-Lysin-Leucin (S-K-L) des PTS1 abweichende Signalsequenz tragen (Swinkels *et al.*, 1992). Folgende Varianten sind demnach möglich: (S,A,C)-(K,R,H)-(L,M) (Lametschwandtner *et al.*, 1998).

PTS2 ist im Gegensatz zu PTS1 im N-terminalen Bereich oder innerhalb der Proteine lokalisiert und konnte nur in wenigen peroxisomalen Matrixproteinen nachgewiesen werden. Die Sequenz besteht aus neun Aminosäuren mit folgenden möglichen Varianten: (R,K)-(L,I,V)-X5-(H,Q)-(L,A) (Legakis & Terlecky, 2001). Erstmals nachgewiesen wurde PTS2 in der 3-Oxo-Acyl-CoA-Thiolase der Ratte, einem Enzym der β -Oxidation (Swinkels *et al.*, 1991). Später konnte PTS2 in der Malat-Dehydrogenase der Wassermelone (Gietl, 1990), der Aldolase der Trypanosomen (Blattner *et al.*, 1992) und in Thiolasen aus *S. cerevisiae* (Marzioch *et al.*, 1994) und des Menschen (Marzioch *et al.*, 1994) isoliert werden. Im Gegensatz zu PTS1 wird PTS2 in einigen Fällen im Anschluss an den Import prozessiert (Jansen *et al.*, 1997).

Zusätzlich gibt es Hinweise auf interne PTS1/PTS2-unabhängige Signalsequenzen, da nicht alle peroxisomalen Matrixproteine ein PTS1 bzw. PTS2 tragen (non-PTS1/PTS2-Proteine). Dies ist z.B. bei der Acyl-CoA-Oxidase (Fox1p/Pot1p) aus *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* und *C. tropicalis* der Fall. Für diese Proteine wird die Existenz interner Signalsequenzen oder eines weiteren PTS-Signals (PTS3) vermutet (Kurbatova *et al.*, 2005; Small *et al.*, 1988).

1.6.2. REZEPTOREN

Entsprechend den beiden PTS1- bzw. PTS2-Signalsequenzen kann zwischen zwei verschiedenen Rezeptorproteinen unterschieden werden: dem PTS1- und PTS2-Rezeptor. Beide PTS-Rezeptoren erkennen und binden im Zytoplasma Proteine, welche ein PTS in ihrer Sequenz aufweisen. Der Matrixprotein-Rezeptor-Komplex wird anschließend zur peroxisomalen Membran transportiert. Mit Hilfe des Translokationsapparats erfolgt dort der Import des Matrixproteins (und des gebundenen PTS1-Rezeptors, siehe 1.6.3) durch die peroxisomale Membran in die Matrix des Peroxisoms. Anschließend kommt es zur Dissoziation des Matrixprotein-Rezeptor-Komplexes (Crookes & Olsen, 1998; Crookes & Olsen, 1999; Subramani, 1998).

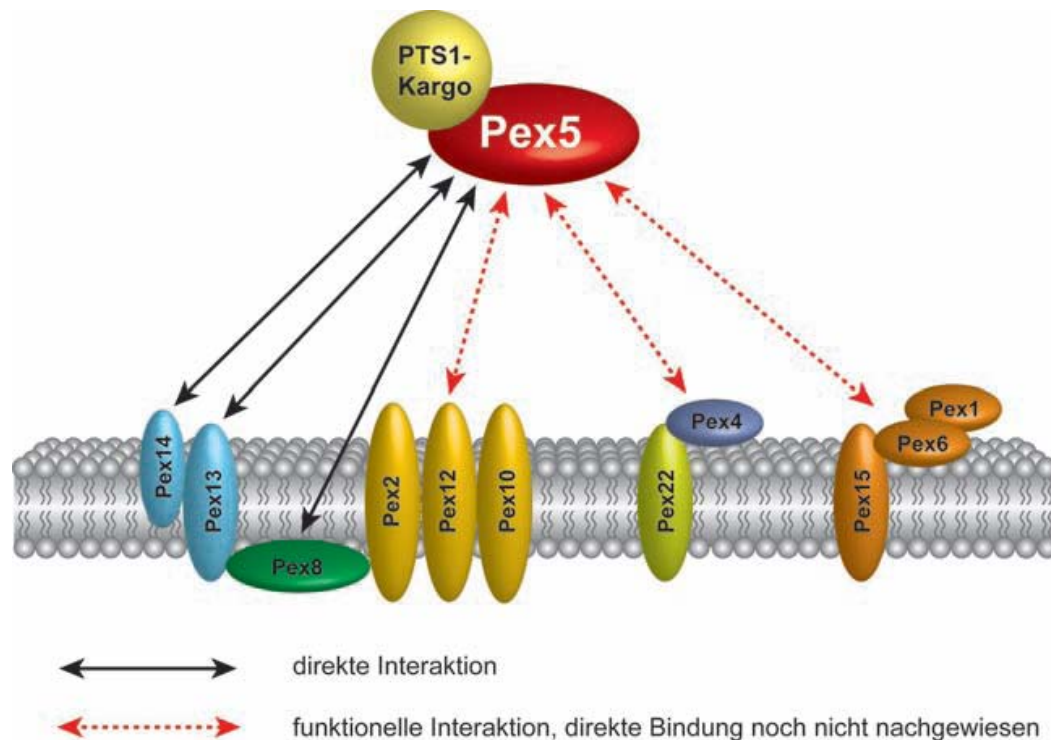


Abb. 1: Interaktionsnetzwerk des PTS1-Rezeptors Pex5p mit dem peroxisomalen Importomer in *S. cerevisiae*. Pex5p geht mit vielen Proteinen des peroxisomalen Importomers direkte oder funktionelle Interaktionen ein: Innerhalb von Pex13p und Pex14p gibt es mehrere Pex5p-Bindestellen, auch mit Pex8p kann der PTS1-Rezeptor direkt interagieren. Für die Ubiquitin-Ligasen Pex2p und Pex12p sowie für das Ubiquitin-konjugierende Enzym Pex4p stellt Pex5p ein spezifisches Substrat dar, ebenso für die AAA-Peroxine Pex1p und Pex6p, die als Translokasen fungieren (aus Hensel *et al.*, 2010).

Der PTS1-Rezeptor PEX5 kann der Familie der TPR-Proteine (tetratricopeptide repeat) zugeordnet werden. Charakteristisch hierfür sind multiple Wiederholungen einer speziellen Konsensussequenz. Brocard *et al.* und Fransen *et al.* gelang der Nachweis der Rezeptorfunktion von PEX5 mittels *in vivo* Analysen (Brocard *et al.*, 1994; Fransen *et al.*, 1995). In *in vitro* Bindungsanalysen konnte die Bindung von PTS1-Sequenzen an PEX5 charakterisiert werden (Braverman *et al.*, 1998 ; Purdue *et al.*, 1997). Ein Funktionsausfall des PTS1-Rezeptors führt in Hefen und beim Menschen zu einem Importdefekt peroxisomaler Matrixproteine. Dieser Ausfall zieht auch eine Störung des PTS2-abhängigen Importweges nach sich (Baes *et al.*, 1997; Dodt *et al.*, 1995; Wiemer *et al.*, 1995). Der PTS1-Rezeptor existiert bei Säugern im Gegensatz zu Hefen in zwei Isoformen PEX5L und PEX5S, welche durch alternatives „splicen“ entstehen. Somit ergeben sich mechanische Unterschiede im Matriximport zwischen Hefen und Säugern (Braverman *et al.*, 1998; Otera *et al.*, 2000).

Der PTS2-Rezeptor wird durch das PEX7-Gen kodiert. Der PTS2-Rezeptor besitzt sechs WD40 Motive (Marzioch *et al.*, 1994), welche Interaktionen zwischen verschiedenen Kargoproteinen und PEX7 ermöglichen (Elgersma *et al.*, 1998; Zhang & Lazarow, 1996).

Heute wird das Modell der zyklisierenden Rezeptoren allgemein akzeptiert. Dieses postuliert, dass neu synthetisierte Proteine im Zytosol von Importrezeptoren erkannt werden, und von diesen Rezeptoren dann zur peroxisomalen Membran dirigiert werden. Die meisten peroxisomalen Matrixproteine besitzen ein PTS1-Motiv, mit geringerer Häufigkeit ein PTS2-Motiv, die vom Rezeptor-Peroxin PEX5 bzw. PEX7 erkannt und gebunden werden (s. 1.6.1). Der Importrezeptor PEX5 spielt für die peroxisomale Importmaschinerie eine entscheidende Rolle (Abb. 1). Dieser Rezeptor kommt in allen Zellen in zwei Zustandsformen vor. Im Zytosol in löslicher Form und in den Peroxisomen in einer integralen membran-gebundenen Form (Girzalsky *et al.*, 2010; Meinecke *et al.*, 2010). Die löslichen Rezeptoren binden PTS-haltige Kargoproteine im Zytosol und dirigieren sie zur peroxisomalen Membran. Die kargobeladenen PTS-Rezeptoren binden die Peroxine PEX13 und PEX14 (in Hefen zusätzlich PEX17) und bilden an der peroxisomalen Membran den sogenannten Docking-Komplex (s. 1.6.3). Das Modell der transienten Pore wurde bisher in der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt. Ein ähnlicher Ablauf wird auch im humanen Organismus vermutet.

1.6.3. PEROXISOMALES DOCKING, TRANSLOKATION UND REZEPTOR RECYCLING

Die mit jeweiligen Matrixproteinen beladenen Rezeptoren PEX5 und PEX7 binden an den sogenannten „Docking-Komplex“ der peroxisomalen Membran. Dabei bilden sich in Hefen und beim Menschen unterschiedliche Proteinkomplexe:

In Hefen sind die Peroxine PEX13, PEX14 und PEX17 beteiligt (Agne *et al.*, 2003). Dabei werden die Matrixproteine von PEX5 am C-Terminus (Urquhart *et al.*, 2000) und von PEX7 am N-Terminus (Girzalsky *et al.*, 1999) gebunden.

Beim Menschen wird die Kopplung des PTS2-Rezeptors an die Matrixproteine von der Isoform des PEX5L-Rezeptors vermittelt und erfolgt nicht wie bei Hefen PEX5-unabhängig (Braverman *et al.*, 1998; Otera *et al.*, 2000).

Die löslichen Rezeptoren (s.1.6.2) binden PTS-haltige Kargoproteine im Zytosol und dirigieren sie zur peroxisomalen Membran. Die kargobeladenen PTS-Rezeptoren binden die Peroxine PEX13 und PEX14 (in Hefen zusätzlich PEX17) und bilden an der peroxisomalen Membran den sogenannten Docking-Komplex. Diese Zugabe von kargobeladenen Rezeptoren induziert die Öffnung einer wassergefüllten Pore (Abb. 2). Die Pore ist dabei so flexibel, dass sie ihren Öffnungszustand von der Größe der Rezeptor-Kargo-Komplexe abhängig macht. Es konnten Öffnungszustände bis 9 nm nachgewiesen werden (Meinecke *et al.*, 2010; Mast *et al.*, 2010). Es wird vermutet, daß PEX5 in die peroximale

Membran inseriert wird und somit die Translokationspore bildet. PEX8, das sich an der Innenseite der peroxisomalen Membran befindet, verbindet den Docking-Komplex mit dem RING-Finger-Komplex. PEX8 ist vermutlich für die Kargo-Dissoziation verantwortlich, da es sowohl ein PTS1- als auch ein PTS2-Motiv besitzt und in der Lage ist, mit PEX5 und PEX7 Wechselwirkungen einzugehen (Platta *et al.*, 2009).

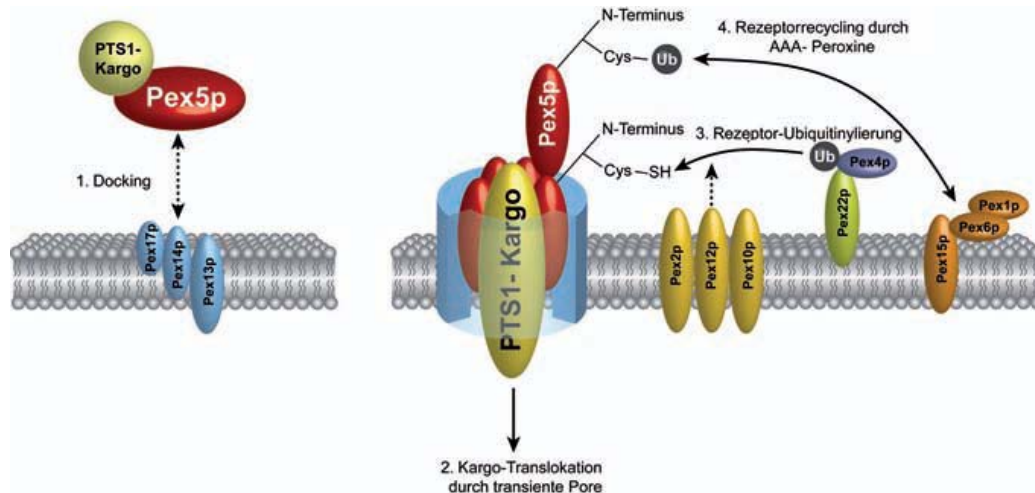


Abb. 2: Modell der transienten Importpore in *S. cerevisiae*. Pex5p dirigiert Kargoproteine zur Peroxisomenoberfläche und inseriert diese als Rezeptor-Kargo-Komplex in die peroxisomale Membran, wodurch eine temporäre Importpore gebildet wird. Den Docking-Peroxinen Pex13p, Pex14p und Pex17p wird dabei eine Funktion als Porenregulator bzw. -stabilisator zugewiesen. Die Disassemblierung der Pore wird vermutlich durch eine Pex4p-vermittelte Ubiquitinierung von Pex5p initiiert. Hierbei fungieren die „RING“-Peroxine Pex2p, Pex10p und Pex12p als Ubiquitin-Ligasen. Der ubiquitinylierte Rezeptor wird dann durch Pex1p und Pex6p in das Zytosol exportiert (aus Hensel *et al.*, 2010).

Nach dem Docking der Rezeptor-Kargo-Komplexe an die peroxisomale Membran erfolgt die Translokation des Matrixproteins (Kargo) durch die Membran ins Innere des Peroxisoms. Das klassische „receptor-shuttle“-Modell geht davon aus, dass das Kargoprotein durch die Membran in die peroxisomale Matrix transloziert wird, während das Rezeptorprotein wieder frei wird und erneut beladen werden kann. Der Import erfolgt vermutlich unter Beteiligung der drei Ring-Finger-Proteine PEX2, PEX10 und PEX12.

Neuere Erkenntnisse führen zur Entstehung des „extended-shuttle“-Modells. Hier wird der Komplex aus Rezeptorprotein und Kargoprotein durch die peroxisomale Membran in die peroxisomale Matrix geschleust, wo dann der Rezeptor wieder frei wird.

Komplexe bestehend aus PEX10 und PEX12 binden z.B. den PTS1-Rezeptor PEX5 (Okumoto *et al.*, 2000) und steuern zusammen mit PEX2 die Dissoziation von Rezeptor und Kargoprotein auf die Innenseite der peroxisomalen Membran. Der Rezeptor gelangt anschließend auf ungeklärtem Weg erneut durch die Membran zurück ins Zytosol. In Hefen sind wahrscheinlich die Proteine PEX4 und

PEX22 am Prozess des Rezeptor-Recycling, d.h. an der Rückkehr des Rezeptors ins Zytosol beteiligt (Dammai & Subramani, 2001; Kunau, 2001).

In der Literatur wird auch eine Beteiligung der AAA-Proteine PEX1 und PEX6 an diesem Vorgang diskutiert. Darüber hinaus sind PEX1-PEX6-Heterodimere vorwiegend an der peroxisomalen Membranbiogenese beteiligt und steuern den Proteinimport in die peroxisomale Matrix. PEX1 kann dabei verschiedene Konformationszustände annehmen. Es kommt als Homooligomer im Zytosol und als Heterooligomer im Peroxisom vor. Eine PEX1-PEX6 Interaktion führt zu einer Änderung des Konformationszustandes, welcher den Transport ins Peroxisom ermöglicht. Der Transport von PEX1-PEX6 Komplexen ist ein temperaturabhängiger Vorgang. Das Targeting zu den Peroxisomen erfordert zusätzlich die Anwesenheit und Hydrolyse von ATP. Diese Vorgänge führen zu einem stabileren Konformationszustand von PEX1-PEX6 Komplexen (Matsumoto *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2006; Nashiro *et al.*, 2011).

Das integrale Membranprotein PEX26 stellt einen Docking-Faktor für PEX1-PEX6-Komplexe dar und rekrutiert diese mit Hilfe der Änderung des ATPase-Zyklus zu den Peroxisomen (Titorenko & Rachubinski, 1998; Matsumoto *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2006). Die AAA-Peroxine PEX1 und PEX6 binden dabei über das integrale Membran-Peroxin PEX15 bzw. PEX26 in Säugezellen an die peroxisomale Membran. Mit Hilfe der AAA-ATPasen wird die Freisetzung von PEX5 aus der peroxisomalen Membran zurück in das Zytosol bewirkt (Platta *et al.*, 2005).

1.7. BIOSYNTHESE PEROXISOMALER MEMBRANEN

Über die Biosynthese peroxisomaler Membranen ist insgesamt sehr wenig bekannt. Die Translation der peroxisomalen Membranproteine erfolgt an freien Ribosomen, was für die Proteine PMP70 (Imanaka *et al.*, 1996a; Imanaka *et al.*, 1996b) und PMP22 (Diestelkötter & Just, 1993) gezeigt wurde. Der Transport der Membranproteine zum Peroxisom wird durch ein „Peroxisomales Membranprotein Targeting-Signal“ (m-PTS) gesteuert. Das m-PTS wird von einem eigenen Rezeptor, dem farnesylisierbaren Protein PEX19 (Götte *et al.*, 1998) erkannt und ist somit unabhängig von PEX5 und PEX7. m-PTS besteht aus zwei Elementen; einer Bindungsstelle für den peroxisomalen Membranrezeptor PEX19, und einer oder mehrerer Transmembrandomänen (Gloeckner *et al.*, 2000; Brown & Baker, 2003; Eckert & Erdmann, 2003; Landgraf *et al.*, 2003).

In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass PEX19 an die m-PTS der PMPs binden kann (Brosius *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004). PEX19 fungiert daher als ein peroxisomaler Membranproteinrezeptor.

tor, ähnlich wie PEX5 und PEX7 im peroxisomalen Matrixproteinimport. Das Targeting der verschiedenen PMPs ist somit von diesen sog. „PEX19-binding-sites“ abhängig. Diese konnten in zahlreichen PMPs identifiziert werden. Es handelt sich dabei um relativ kurze Aminosäuresequenzen, die alle das gleiche Motiv beinhalten und können als integraler Teil des m-PTS gesehen werden. Eine „binding-site“ umfasst eine Region von elf konservierten hydrophoben Aminosäuren, welche außerdem eine positive Ladung aufweisen (Rottensteiner *et al.*, 2003). Allerdings beschreiben Jones *et al.* zwei verschiedene Wege für den peroxisomalen Membranproteinimport: Zusätzlich zu dem Klasse I-Import, der eine Abhängigkeit zum m-PTS-Rezeptor PEX19 aufweist, existiert noch ein weiterer, PEX19-unabhängiger Klasse II-Import-Weg (Jones *et al.*, 2004).

Zudem stabilisiert PEX19 verschiedene peroxisomale Membranproteine im Zytosol und erleichtert deren Insertion in die peroxisomale Membran (Schliebs & Kunau, 2004).

Es wird vermutet, dass neben PEX19 auch die Peroxine PEX3 und PEX16 an der peroxisomalen Membranbiogenese beteiligt sind (Rucktäschel *et al.*, 2010; Nuttall *et al.*, 2011). Bei Defekten in einem dieser Peroxine sind nicht einmal mehr die sogenannten „peroxisomalen ghosts“ in den Zellen vorzufinden. Es handelt sich dabei um rudimentäre („leere“) peroxisomale Membranstrukturen, bei denen nur noch Membranproteine, (z.B. PMP70 oder PEX11), aber keine Matrixproteine nachweisbar sind. Wenn ein genetischer Defekt in einem *PEX*-Gen zu einem „ghost“-freien zellulären Phänotyp führt, kann dies als Hinweis darauf betrachtet werden, dass dieses Peroxin an einem sehr frühen Schritt der Biogenese beteiligt ist (Götte *et al.*, 1998; Muntau *et al.*, 2000a). Dies konnte für PEX3 und PEX19 sowohl in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Hetteema *et al.*, 2000), als auch in humanen Fibroblasten Zelllinien (Matsuzono *et al.*, 1999; Muntau *et al.*, 2000b) nachgewiesen werden. Darüber hinaus interagieren diese beiden Peroxine *in vitro* (Muntau *et al.*, 2003) und *in vivo* (Fang *et al.*, 2004) miteinander. Diese Erkenntnis führte dazu, dass ihnen eine Schlüsselrolle in der frühen peroxisomalen Membranbiogenese zugeteilt wurde.

PEX3 ist ein integrales Membranprotein (Kammerer *et al.*, 1998), PEX19 ist dagegen überwiegend im Zytosol lokalisiert und enthält einen farnesylierten Abschnitt (Götte *et al.*, 1998). Beide Peroxine sind daran beteiligt, PMPs zu ihrem Bestimmungsort zu leiten (Fang *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2004; Sacksteder *et al.*, 2000). Neueste Untersuchungen konnten die Peroxine PEX3 und PEX19 zunächst in speziellen Subregionen des ER nachweisen. Von diesen Regionen knospen präperoxisomale Vesikel ab, welche PMPs enthalten, die wiederum mit Präperoxisomen fusionieren oder zu funktionellen Peroxisomen heranreifen (Agrawal *et al.*, 2011). Dort wird PEX19 mit Hilfe von PEX3 in diesen sog. „dots“ verankert. Hierbei markiert PEX3 Bindestellen für die Insertion weiterer PMPs an PEX19. Nur mit Hilfe von PEX19 kann PEX3 anschließend das ER wieder verlassen (Hoepfner *et al.*, 2005). Im Anschluss daran konnten die beiden Peroxine in reifen Peroxisomen nachgewiesen werden.

Die essentielle Rolle dieser beiden Peroxine wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass Mutationen im *PEX3*- und/oder im *PEX19*-Gen einen sofortigen Stopp der peroxisomalen Biogenese zur Folge haben (Schliebs & Kunau, 2004).

Nur in Gegenwart von PEX3 ist ein Docking von PEX19, das eine spezielle PEX3-Bindungsstelle aufweist, an die peroxisomale Membran möglich. Zusätzliche Experimente zeigten, dass die mutationsbedingte Inaktivierung der PEX19-Bindestelle am Peroxin PEX3 die Bindung des PEX3-PEX19-Komplexes an die peroxisomale Membran verhindert und somit zur kompletten Inaktivierung der PEX3 Funktion führte (Muntau *et al.*, 2003). PEX3 spielt damit eine wichtige Rolle beim Import von Klasse-I-PMPs und fungiert als Docking-Faktor für PEX19 (=class I PMP import receptor). Für den Klasse-II-Import konnte bisher nur das Peroxin PEX3 identifiziert werden (Fang *et al.*, 2004).

1.8. PEROXISOMALE ABC-TRANSPORTER

Bei ABC-Transportern handelt es sich um eine Klasse von Membranproteinen, die als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Domäne besitzen. Ihre Funktion ist der aktive Transport von spezifischen Substraten durch die verschiedensten Membransysteme der Zelle. Die für den Transport gegen einen Konzentrationsgradienten notwendige Energie wird durch Bindung und anschließende Hydrolyse von ATP gewonnen. Alle ABC-Transporter gehören damit zu den aktiven Transportern (Childs & Ling, 1994; Dean *et al.*, 2001; Higgins, 1992). ABC-Transporter sind in der Zellmembran oder in inneren Membransystemen der Zelle, wie z.B. dem ER, Mitochondrien oder Peroxisomen, lokalisiert und lassen sich in jedem Organismus finden, vom Bakterium bis zum Säugetier und in Pflanzenzellen. Bei allen eukaryotischen Transportern handelt es sich um Exporter. Einige sind substrat-, andere multispezifisch. Die Expression vieler ABC-Transporter erfolgt beim Menschen in den sezernierenden Epithelien, z.B. Darm und Leber.

ABC-Transporter-Gene sind weit verstreut im menschlichen Genom. Die ABC-Transporter-Superfamilie umfasst eine der größten bekannten Proteinfamilien und lässt sich in sieben Subfamilien unterteilen: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG.

Die Subfamilie ABCD enthält Gene, die für Halbtransporter kodieren, die ausschließlich in der peroxisomen Membran lokalisiert sind (Dean *et al.*, 2001). Zu den peroxisomalen Halbtransportern gehören das Adrenoleukodystrophie-Protein ALDP (ABCD1), PMP70 (ABCD3) (Kamijo *et al.*, 1990) und das ALD-„verwandte“ Protein ALDR (ABCD2) (Holzinger *et al.*, 1997a; Holzinger *et al.*, 1999).

Bisher wurde auch PMP 69 (ABCD4) (Holzinger *et al.*, 1997b) als peroxisomales ABC-Protein angesehen und somit zusammen mit ABCD1, ABCD2 und ABCD3 den peroxisomalen Membranproteinen zugeordnet (Shani *et al.*, 1997). Neuere Untersuchungen zeigen, dass es sich bei ABCD4 um ein ER-Protein handelt, das nicht peroxisomal, mitochondrial oder lysosomal lokalisiert ist. Verantwortlich hierfür ist ein Unterschied in der Aminosäuresequenz in der NH₂-terminalen Region. ABCD1, ABCD2 und ABCD3 besitzen eine hydrophile NH₂-Domäne, welche die Weiterleitung zum Peroxisom ermöglicht. Dagegen verfügt ABCD4 über eine hydrophobe NH₂-Domäne, die für die Weiterleitung zum ER verantwortlich ist. Durch die Interaktion von ABCD4 mit PEX19 wird ein stabilerer Konformationszustand von ABCD4 herbeigeführt und die Weiterleitung zum Peroxisom ermöglicht (Kashiwayama *et al.*, 2009).

Jeder funktionelle ABC-Transporter besteht aus zwei hydrophoben transmembranen Domänen (TMD), die typischerweise sechs membranüberspannende α -Helices beinhalten und zwei hydrophile Domänen, welche die ATP-bindende Kasette enthalten (Klein *et al.*, 1999). Die hydrophobe Permease-Domäne bildet einen Kanal, wodurch der Transport des Substrats ermöglicht wird, und ist darüber hinaus auch für die Spezifität des Substrates verantwortlich.

Die ATP-bindende Domäne ist auch bekannt als sog. nucleotide binding folds (NBF). Dieses ist aus drei Sub-Domänen zusammengesetzt: aus WalkerA, WalkerB dem signature motif (C-Domäne), die den ABC-Transportern ihre Namen geben (Abb. 3). Die C-Domäne ist ABC-Transporter spezifisch und ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen ATP-bindenden-Proteinen (Hyde *et al.*, 1990).

Das prototype ABC-Protein besteht aus je zwei NBF und zwei TMD, wobei ABC-Gene als „Full-“ (2TMD + 2NBF) oder als „Half-“ Transporter (1TMD + 1NBF) oder auch einzeln (TMD1/TMD2/NBF1/NBF2) organisiert sein können (Abb. 4). Halbtransporter bilden Homo- oder Heterodimere, um einen funktionierenden Transporter zu schaffen. Ein funktioneller Transporter kann sowohl aus zwei verschiedenen Permease- und ATPase-Untereinheiten bestehen als auch aus zwei Homodimeren oder aus einer Kombination von einem Homo- und einem Heterodimer (Dean, 2005; Shani *et al.*, 1996).

Prokaryotische ABC-Transporter sind in den meisten Fällen Tetramere und bestehen aus zwei separaten membrandurchspannenden Permease- und zwei ATPase-Untereinheiten. Letztere binden spezifisch an ihre Permeaseuntereinheit (Xu *et al.*, 2004). Beim Menschen handelt es sich bei den meisten der ca. 48 bekannten ABC-Transporter jedoch um Monomere, die insgesamt aus zwei TMD und zwei ATP-bindenden-Kassetten aufgebaut sind (Venter *et al.*, 2001).

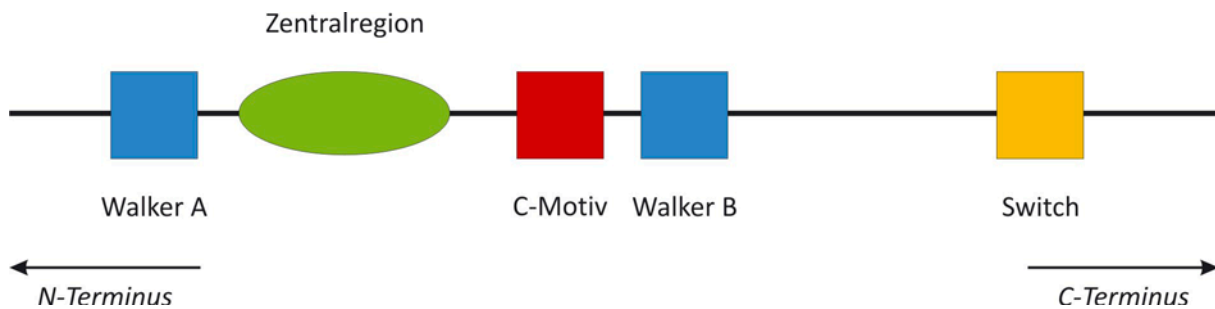


Abb. 3: Die ATP-bindende Domäne der ABC-Transporter. Die Aminosäuresequenz der ca. 200 Aminosäurereste großen ATP-bindenden Domäne zeichnet sich durch fünf konservierte Motive aus: Die Walkermotive A und B, die etwa 90 bis 120 Aminosäurereste auseinander liegen (blau), das Signaturmotiv (C-Motiv, rot), das die Konsensussequenz LSGGQ enthält, die weniger stark konservierte Zentralregion (grün) und die ebenfalls weniger stark konservierte „Switch-Region“ (gelb). Modifiziert nach Schneider, 1998

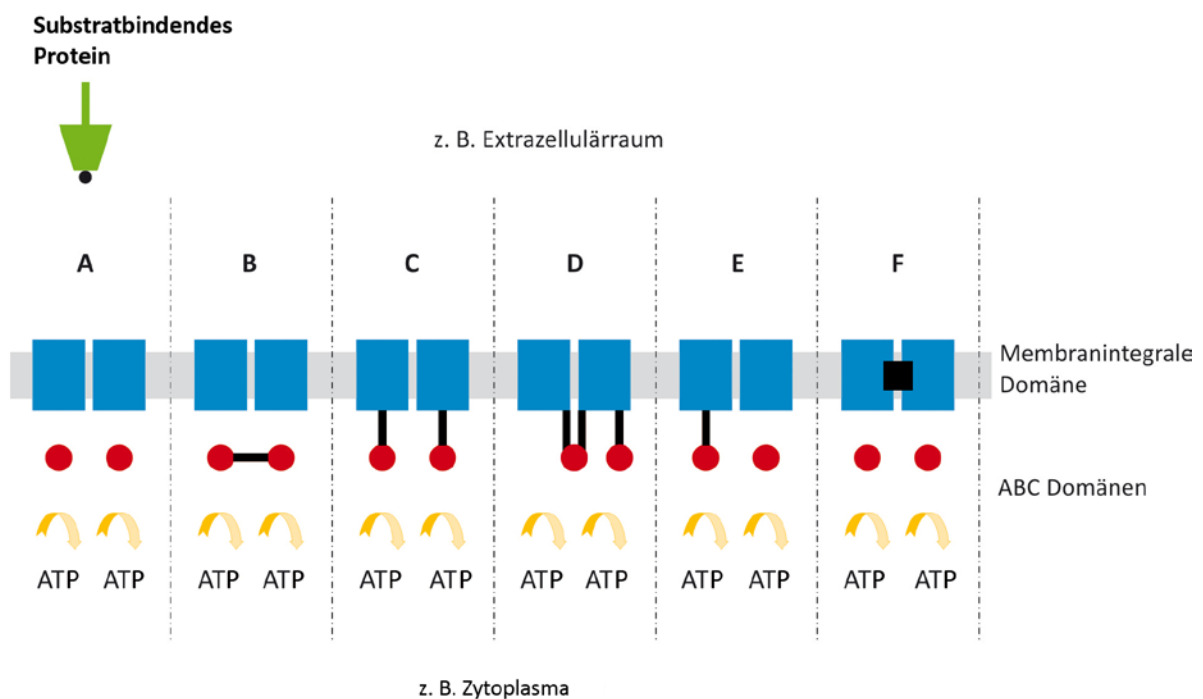


Abb. 4: Modularer Aufbau eines ABC-Transporters. Zwei in die Membran (grau) integrierte Transmembrandomänen (blau), die wahrscheinlich den eigentlichen Transportkanal darstellen, bilden mit den zwei ABC-Domänen (rot) einen funktionalen ABC-Transporter. Die ABC-Domänen hydrolisieren ATP und stellen somit die notwendige Energie für den Transportvorgang zur Verfügung. (A) Die einzelnen Domänen können als separate Proteine vorliegen, wie es bei bakteriellen ABC-Transportern meist der Fall ist. Das für bakterielle Importsysteme typische Substratbindeprotein (grün) ist ebenfalls dargestellt (B, C, E, F). Die einzelnen Domänen können in unterschiedlicher Kombination oder vollständig (D) zu einem Polypeptid fusioniert sein. Transporter des Typs (D) stellen die Mehrzahl der ABC-Transporter bei Säugetieren dar. Modifiziert nach Schneider, 2000.

1.9. DIE VERWENDUNG VON GFP-FUSIONSPROTEINEN ALS HILFSMITTEL BEI DER CHARAKTERISIERUNG PEROXISOMALER PROTEIN-PROTEIN WECHSELWIRKUNGEN

Das Wildtyp green fluorescent protein (GFP) stammt von der Qualle *Aequorea victoria*. GFP reagiert mit der Abgabe von Lichtenergie, sobald es Energie vom Photoprotein aequorin erhält, das durch Ca^{2+} -Ionen aktiviert wurde (Morin & Hastings, 1971; Shimomura *et al.*, 1962; Ward *et al.*, 1980).

Beim GFP-Protein handelt es sich um ein 238 Aminosäuren umfassendes Polypeptid. Dieses enthält eine α -Helix, welche das Chromophor umspannt (Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Das Chromophor ist ein zyklisches Tripeptid, bestehend aus den Aminosäuren Ser-Tyr-Gly (Cody *et al.*, 1993). Dieser Aufbau ist Voraussetzung für die Fluoreszenz des Chromophors, das jedoch allein nicht in der Lage ist, zu fluoreszieren. Zusätzlich werden dazu die Aminosäuren aa7-229 von GFP benötigt (Li *et al.*, 1997).

Die Expression von GFP in eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen führt nach Anregung des Fluorophors mit blauem oder UV-Licht zur Emission leuchtend grüner Fluoreszenz. Lichtstimulierte GFP-Fluoreszenz ist speziesunabhängig und benötigt keine Co-Faktoren, Substrate oder Genprodukte von *A. victoria*. Somit ist die Anwendung der GFP-Fluoreszenz in Zellen und Geweben *in vivo* und *in vitro* möglich.

Durch geringfügige Mutationen im Chromophor oder im restlichen GFP-Protein sind neue GFP-Varianten entstanden. Diese Änderungen der Aminosäuresequenz führen zu einem veränderten Spektralverhalten von GFP. Häufig verwendet werden die Exzitationsvarianten EGFP (enhanced green fluorescent protein) und destabilized EGFP (dEGFP) (Li *et al.*, 1998). Die Exzitationsspektren dieser Varianten weisen einen vermehrten Rotanteil auf, was zu einer bis zu 35-fach gesteigerten Fluoreszenz gegenüber GFP führt.

Als Hilfsmittel für die Charakterisierung von Proteinwechselwirkungen wurden in der hier vorliegenden Arbeit die Farbvarianten EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) und ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) genutzt. EYFP verlagert das Emissionsspektrum von grün nach gelb-grün und ist dem Fluoreszenzverhalten von EGFP ähnlich. Beim ECFP wurde die Aminosäuresequenz an vier Positionen verändert, wodurch sich das Emissionsspektrum von grün nach cyan verlagert. Außerdem können ECFP und EYFP für FRET Experimente verwendet werden. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass sich der Emissionsbereich von ECFP und der Exzitationsbereich von EYFP überlagern. Somit ist eine Energieübertragung von ECFP auf EYFP möglich, falls sich beide Moleküle in einem hinreichend kleinen räumlichen Abstand ($<100 \text{ \AA}$) zueinander befinden.

Ein weiterer Vorteil der Proteinvarianten gegenüber dem Wildtyp liegt in der höheren Temperaturreistenz. So können Zellen auch bei höheren Temperaturen gezüchtet werden, was zu einer stärkeren Expression der Proteine führt und sie somit leichter detektierbar macht.

Darüber hinaus ist die Detektion der GFP-Expression durch den Einsatz polyklonaler Antikörper mittels Westernblot möglich, da alle GFP-Varianten starke immunogene Epitope sind. Aufgrund der ähnlichen Aminosäuresequenz der GFP-Varianten erkennen kommerziell erhältliche Antikörper fast alle Farbvarianten von GFP.

Da es sich bei den GFP-Varianten um relativ große Proteine handelt, muss eine mögliche sterische Behinderung von Proteinwechselwirkungen in Betracht gezogen werden. Deshalb ist es unter Umständen wichtig zu beachten, ob die GFP-Varianten am N- oder C-Terminus lokalisiert sind. Eine Beeinträchtigung von Proteinwechselwirkungen durch Lokalisation von GFP am N- bzw. C-Terminus wurde für die Proteine PMP22 (Brosius *et al.*, 2002) sowie PEX3 und PEX22 (Koller *et al.*, 1999; Soukupova *et al.*, 1999) nachgewiesen.

Allerdings konnte durch den Einsatz von GFP-Varianten bereits die Interaktion zwischen PEX3 und PEX19 erfolgreich fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Das an den N-Terminus von PEX19 fusionierte ECFP und das an den C-Terminus von PEX3 fusionierte EYFP beeinträchtigten in keiner Weise die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Peroxinen (Muntau *et al.*, 2003a; Muntau *et al.*, 2003b).

1.10. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Zur Aufklärung von Protein-Protein Wechselwirkungen der frühen Phase der peroxisomalen Biogenese wurden bereits von Muntau *et al.* peroxisomale CFP- bzw. YFP-Fusionsproteine in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgreich verwendet (Muntau *et al.*, 2003a; Muntau *et al.*, 2003b). Im Rahmen dieser Arbeit soll diese Methodik auf biochemische bzw. fluoreszenzspektroskopische Anwendungen erweitert werden, um die Protein-Protein Wechselwirkungen peroxisomaler Membranproteine näher charakterisieren zu können. Entsprechende versuchstechnische Verfahren sollten hierzu etabliert und angewandt werden.

Hierzu sollten Fusionsproteinvarianten peroxisomaler Membranproteine verwendet werden, welche N- oder C-terminal mit den fluoreszierenden Proteinen YFP/CFP fusioniert wurden. Anhand der Eigenfluoreszenz dieser Proteine kann die Expression der Fusionsproteine *in vivo* und *in vitro* fluoreszenzspektroskopisch detektiert und zusätzlich deren Interaktionen mittels fluorescence resonance

energy transfer (FRET) charakterisiert werden. Die CFP- bzw. YFP- Fusionsproteinanteile stellen außerdem starke immunogene Epitope dar, welche von kommerziell erhältlichen Antikörpern erkannt und gebunden werden. Somit können CFP- bzw. YFP- Fusionsproteine auch biochemisch mittels (Co)-Immunpräzipitation charakterisiert werden.

Diese spezielle Methodik sollte zunächst auf die in der Literatur beschriebene bekannte Homodimerisierung des membranständigen peroxisomalen ABC-Halbtransportes ABCD1 (ALDP) (Liu *et al.*, 1999) angewandt und anhand dieser Interaktion etabliert werden. Anschließend sollte die potentielle Homo- bzw. Heterodimerisierung weiterer peroxisomaler ABC-Halbtransporter untersucht werden.

Darüberhinaus sollten mit dieser Methodik die Protein-Protein Wechselwirkungen des peroxisomalen Membranproteins PEX26 mit dem peroxisomalen Membranproteinrezeptor PEX19 näher charakterisiert werden.

Außerdem sollte überprüft werden, ob sich diese Methodik auch zur Identifikation bisher unbekannter Protein-Protein Wechselwirkungen eignet. Dazu sollten neue Interaktionspartner des peroxisomalen Membranproteins PEX3 identifiziert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN UND GERÄTE:

2.1.1. CHEMIKALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität von den Firmen Bio-Rad (München), Biozym Diagnostik (Oldendorf), GibcoBRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), SIGMA-ALDRICH GmbH (Steinheim, Taufkirchen) und Pharmacia (Freiburg) bezogen.

2.1.2. PUFFER UND LÖSUNGEN

Die allgemein gebräuchlichen Puffer und Lösungen wurden mit H₂O bidest., das aus der Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU bezogen wurde, hergestellt. Anwendungsspezifische Puffer werden bei der jeweiligen Methode beschrieben.

Puffer	Zusammensetzung	Anmerkungen
PBS	10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH=7,4	SIGMA-ALDRICH GmbH (Steinheim, Taufkirchen)
TBE-Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH=8,0	pH=8,0 einstellen mit HCl
TBS-Puffer	20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH=7,5	
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0	

2.1.3. BAKTERIENSTÄMME

<i>E. coli</i> BL21 Codon Plus-RIL	Fa. Stratagene, La Jolla (USA)
---	---------------------------------------

2.1.4. ANZUCHTMEDIEN

Medium	Zusammensetzung	Anmerkung
LB-Medium	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH=7,4	Ad 1000 ml H ₂ O bidest., autoklavieren
Selektive LB-Agarplatten	LB-Medium + 20 g Agar, 50 µg/ml Ampicillin	ad 1000 ml LB-Medium, autoklavieren, Zugabe von Ampicillin nach Abkühlung auf 50°C

2.1.5. EUKARYOTISCHE ZELLINIEN

Bezeichnung	Zellart	Bezugsquelle
HF1/D3	SV40 immortalisierte humane Fibroblasten	Institut für Bodenkultur, Wien (A) - Department für Biotechnologie

2.1.6. MEDIEN, PUFFER UND ANTIBIOTIKA FÜR DIE EUKARYOTISCHE ZELLKULTUR

Bezeichnung	Bezugsquelle
DMEM Low Glucose (1,0 g/l)	PAA, Pasching (A)
Ampicillin-Lösung	PAA, Pasching (A)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Versen-Trypsin-Lösung	Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU

2.1.7. ENZYME

<i>EcoRI</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>BamHI</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>HindIII</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.8. EINGESETZTE MATERIALIEN FÜR DIE DNA-SEQUENZIERUNG

Alkohol 100%	Alkohol 70%	Natrium-Acetat NaOAc (3 M; pH=5,2)
--------------	-------------	------------------------------------

2.1.9. AFFINITÄTSSÄULEN UND -MATRICES

Folgende Kits wurden zur Reinigung von Plasmiden und PCR-Produkten verwendet:

Plasmid-Mini Kit	Qiagen, Hilden (USA)
Plasmid-Maxi Kit	Qiagen, Hilden (USA)

2.1.10. LÄNGEN- UND MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS

DNA-Längenstandard	
1 Kb DNA-Längenstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Protein-Molekulargewichtstandard	
SeeBlue Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.11. REAGENZIEN FÜR DIE HORIZONTALE GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN

Bezeichnung	Herkunft
SeaKem LE Agarose	Cambex BioScience, Rockland, ME (USA)
Ethidiumbromid Dropper Bottle 0,625 g/ml	Olerup SSP AB, Stockholm (Schweden)
Gel Loading Solution (6x)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim

2.1.12. ANTIKÖRPER, SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER UND NACHWEISREAGENZIEN

Verwendete primäre Antikörper:

Antikörper	Herkunft	Bezugsquelle
Living Colors A.v. (JL-8) XFP*	Monoklonaler Mouse-Ak	Clontech Laboratories (USA)
Living Colors A.v Peptide -AK XFP*	Peptid-Antikörper (Rabbit)	Clontech Laboratories (USA)
HA	Polyklonaler Rat-AK, Klon 3710	Boehringer, Mannheim
Myc	monoklonaler Mouse-AK, Klon 9E10	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Alternativ wurden Antikörper der Fa. Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach verwendet, die bereits mit ProteinG-MicroBeads gekoppelt waren:

Antikörper	Epitop	Epitop-Herkunft	Isotype
μMACS Anti-c-myc MicroBeads	EQKLISEEDL	Human-c-myc protooncogene	Mouse IgG1
μMACS Anti-HA MicroBeads	YPYDVPDYA	Influenza virus hemmagglutinin	Mouse IgG1
μMACS Anti-His MicroBeads	HHHHHH	Syntetic	Mouse IgG2b
μMACS Anti-GFP* MicroBeads	Green fluorescent protein	<i>Aequorea vivtoria</i> jellyfish	Mouse IgG1

*Die in dieser Arbeit verwendeten anti-GFP-Antikörper binden an alle verwendeten GFP-Farbvarianten (CFP, GFP, YFP, vgl. Kapitel 1.9). Zum besseren Verständnis wurde in den folgenden Kapiteln meist „anti-XFP“ im Text durch die gerade verwendete spezielle Farbvariante (z. B. „anti-YFP“) ersetzt.

Als sekundäre AK wurden ausschließlich Antikörper der Fa. Promega Corporation, Madision (USA) verwendet:

Antikörper	Verdünnung
Anti-Mouse	1:7500 in 10% Milchpulver/TBS
Anti-Rabbit	1:7500 in 10% Milchpulver/TBS
Anti-Rat	1:2500 in 10% Milchpulver/TBS

Nachweisreagenz:

CDP-Star	Boehringer, Mannheim
----------	----------------------

2.1.13. TRANSFEKTIONSREAGENZIEN UND -MATERIAL

Bezeichnung	Herkunft
PolyMAG BL 16/1	Chemicell GmbH, Berlin
Magnetplatten	Chemicell GmbH, Berlin

2.1.14. REAGENZIEN FÜR IMMUNPRÄZIPITATION

Bezeichnung	Bezugsquelle
<u>Lyse-Puffer:</u> 0,5% Triton X100, 5 mM EDTA in PBS	“Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets” (Roche, one tablet à 10 ml)
NuPage LDS Sample buffer (4x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
250 mM DSP	In DMSO gelöst Pierce, Rockford (USA)
DTT	Pierce, Rockford (USA)

2.1.15. REAGENZIEN FÜR DIE DISKONTINUIERLICHE POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE) VON PROTEINEN

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde das SDS-PAGE System der Firma Invitrogen, Karlsruhe verwendet.

NuPAGE® BisTris Gel 4-12%	
NuPAGE® 4x LDS Sample Buffer	
NuPAGE® 10x Reducing Agent	
NuPAGE® 20x MOPS SDS Running Buffer	<p><u>Laufpuffer 1:</u> 50 ml NuPAGE® 20x MOPS SDS Running Buffer ad 1000 ml H₂O bidest.</p> <p><u>Laufpuffer 2:</u> 200 ml Laufpuffer 1 plus 500 µl Antioxidant Reagent</p>
NuPAGE® Antioxidant Reagent	

2.1.16. MATERIALIEN FÜR WESTERNBLOT UND IMMUNDETEKTION

Für die Westernblot Analysen wurde ebenfalls das NuPAGE® System der Firma Invitrogen, Karlsruhe verwendet.

NuPAGE® 20x Transfer Buffer	50 ml Transfer Buffer, 200 ml Methanol ad 1000 ml H ₂ O bidest., 1 ml Antioxidant Reagent
TBS	20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7,5
TBS-T	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,5 0,5% (v/v) Tween 20
Blockpuffer/Inkubationspuffer 1	5 g Milchpulver ad 100 ml TBS
Blockpuffer/Inkubationspuffer 2	10 g Milchpulver ad 100 ml TBS
AP-Detektionspuffer	0,1 M TrisHCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5
CDP-Star™ 25 mM (1:100 verdünnt)	50 µl ad 5 ml AP-Detektionspuffer
Blocklösung:	3% BSA/TBS oder 10% Milchpulver/TBS (abhängig vom AK, siehe Tab.6)
Inkubationspuffer	5% Milchpulver /TBS

Waschpuffer	TBS-T (TBS+0,05% Tween-20) oder TBS (abhängig vom AK)
Primärer Antikörper	Anti-XFP Anti-HA Anti-myc Anti-his (vgl. Tab.6)
Sekundärer Antikörper	Anti-mouse Anti-rabbit Anti-rat (vgl. Tab.7)
Stripping-Puffer	100 mM b-Mercaptoethanol 62,5 mM Tris-HCL ph 6,8l 2% (w/v) SDS

2.1.17. MEMBRANEN UND BLOTTINGPAPIER

Die Nitrocellulosemembran Optitran BA-S85 für den Proteintransfer und das Blot-Filterpapier wurden von der Schleicher & Schuell GmbH (Dassel) bezogen.

2.1.18. VEKTOREN UND PLASMIDE

Name	Bemerkung bzw. codiertes Protein	Bezugsquelle
pEGFP	N-terminale Protein-Fusions-Vektor für Fusionsproteine mit GFP	BD Clontech, San Diego, USA
pEYFP	N-terminale Protein-Fusions-Vektor für Fusionsproteine mit der gelb-grünen Variante (YFP) des grün fluoreszierenden Proteins	BD Clontech, San Diego, USA

pECFP	N-terminale Protein-Fusions-Vektor für Fusionsproteine mit der cyan Variante (CFP) des des grün fluoreszierenden Proteins	BD Clontech, San Diego, USA
ABCD1-YFP	humanes ABCD1 (fl) N-terminal fusioniert an YFP	Landgraf*
ABCD4-YFP	humanes ABCD4 (fl) N-terminal fusioniert an YFP	Schatz*
ABCD1-HA	humanes ABCD1 (fl) C-terminal fusioniert an HA	Landgraf*
ABCD2-HA	humanes ABCD4 (fl) C-terminal fusioniert an HA	Landgraf*
HA-PEX19-fl	humanes Peroxin PEX19 (fl) C-terminal fusioniert an CFP	Kammerer, 1998
YFP-PEX26-fl	humanes Peroxin PEX26 (fl) C-terminal fusioniert an YFP	Mayerhofer*
YFP-(aa1-211)PEX26	aa 1-211 des humanen PEX26 C-terminal fusioniert an YFP	Mayerhofer*
YFP-(aa212-305)PEX26	aa 212-305 des humanen PEX26 C-terminal fusioniert an YFP	Mayerhofer*
YFP-(aa225-305)PEX26	aa 225-305 des humanen PEX26 C-terminal fusioniert an YFP	Mayerhofer*
YFP-(aa242-305)PEX26	aa 242-305 des humanen PEX26 C-terminal fusioniert an YFP	Mayerhofer*
YFP-PEX26 aa242-280	aa 242-280 des humanen PEX26 C-terminal fusioniert an YFP	Mayerhofer*
YFP-PEX26 aa212-270	aa 212-270 des humanen PEX26	Mayerhofer*

	C-terminal fusioniert an YFP	
CFP-PEX19-fl	humanes Peroxin PEX19 (fl) C-terminal fusioniert an CFP	Mayerhofer*
CFP-PEX19-D1	Domäne 1 des humanes Peroxin PEX19 C-terminal fusioniert an CFP	Mayerhofer*
CFP-PEX19-D1,2	Domänen 1 und 2 des humanes Peroxin PEX19 C-terminal fusioniert an CFP	Mayerhofer*
CFP-PEX19-D2	Domäne 2 des humanes Peroxin PEX19 C-terminal fusioniert an CFP	Mayerhofer*
CFP-PEX19-D2,3	Domänen 2 und 3 des humanes Peroxin PEX19 C-terminal fusioniert an CFP	Mayerhofer*
CFP-PEX19-D3	Domäne 3 des humanes Peroxin PEX19 C-terminal fusioniert an CFP	Mayerhofer*
GFP-PEX3aa1-40	aa 1-40 des humanen PEX3 N-terminal fusioniert an GFP	Kammerer, 1998

GFP: Grün fluoreszierenden Protein;

YFP: Gelb-grünen Variante von GFP;

CFP: Cyan Variante von GFP

aa: Aminosäuren

fl: full length

* unpubliziert

2.1.19. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND SPEZIELLE GERÄTE

10 ml Falcon-Röhrchen	
50 ml Falcon-Röhrchen	
75 ml Kulturflasche	
12-Well Multiwellplatte	
PAGE-Apparatur	Xcell SureLock™ Mini Cell, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135, Zeiss, Göttingen
Objektive	Plan NEOFLUAR 100x / 1,3 Oil; Zeiss LD ACHROPLAN 63x / 0,75 Korr P2; Zeiss LD A-Plan 40x / 0,50 Ph2; Zeiss
Kamera/Bilddarstellungssoftware	AxioCam MRm / Axiovision Software; Zeiss, Göttingen
Fluoreszenzmikroskopfilter F31-005, D 548/10, 565 DCLP, D 630/60 F41-028, HQ 500/20, Q 515 LP , HQ 535/30	Zeiss, Göttingen
Spektrophotometer	Ultrospec 1000. Pharmacia Biotech, Cambridge (GB)

2.2. METHODEN

2.2.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1.1. ANZUCHT VON *ESCHERICHIA COLI*

E.coli-Stämme wurden in LB-Medium über Nacht bei 37° C herangezogen. Die Kultivierung erfolgte auf Festagarplatten oder wahlweise in Erlenmeyerkolben bzw. Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler. Falls benötigt, wurden Antibiotika (Ampicillin) in einer Konzentration von 0,50 µg/ml zugesetzt. *E.coli* Zellen wurden durch Zentrifugation für 10-15 min bei 3400 U/min geerntet.

2.2.1.2. *ESCHERICHIA COLI* DAUERKULTUREN

Um *E.coli*-Stämme bzw. Transformanten über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurde ein Glycerinstock angelegt. Hierzu wurden je 0,5 ml Bakteriensuspension mit 0,5 ml 85%-igem sterilem Glycerol vermischt und bei –80° C gelagert.

2.2.1.3. TRANSFORMATION CHEMISCH KOMPETENTER *ESCHERICHIA COLI*-ZELLEN

Prinzipien

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien, was 1944 von O. Avery nachgewiesen werden konnte. Dieser Vorgang ist essentiell für die Klonierung von DNA-Abschnitten.

Durchführung

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (Fa. Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit Plasmid-DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Je Transformation wurden dabei ca. 100 µl *E.coli*-Zellen und bis zu 10 µg DNA verwendet. Um die Aufnahme der Plasmid-DNA in das Bakterium zu ermöglichen, wurde die Bakteriensuspension für 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42° C ausgesetzt und anschließend für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert.

Danach wurden 500 µl SOC-Medium (Fa. Stratagene) zur Bakteriensuspension zugesetzt und eine Stunde lang bei einer Temperatur von 37° C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Antibiotikum-Selektiv-LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37° C wuchsen nur aus denjenigen Zellen Kolonien hervor, die das Plasmid aufgenommen hatten, welches das Antibiotikum-Resistenzgen trug.

2.2.1.4. ISOLIERUNG VON PLASMIDEN AUS *ESCHERICHIA COLI* ZELLEN

Miniprep von Plasmid-DNA

Mit Hilfe der DNA-Miniprep war die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen möglich. Die Miniprep gliedert sich in drei Abschnitte: Lyse, Neutralisation und Reinigung. Im letzten Schritt wird die Plasmid-DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silikatmatrix gebunden. Nach Entfernung der Salze konnten so aus 1,0 - 5,0 ml Übernachtskulturen von *E.coli*, bis zu 20 µg Plasmid-DNA isoliert werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß dem Protokoll der Firma Qiagen.

Maxiprep

Größere Mengen an Plasmiden und eine reinere DNA wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Maxiprep gewonnen. Mit dem QIAfilter Plasmid Purification Maxi-Kit können bis zu 500 µg DNA aus 200 ml *E. coli* Flüssigkultur isoliert werden. Dieses Verfahren ist der Miniprep analog, allerdings wird die Plasmid-DNA nach der Neutralisation an eine andere stationäre Phase gebunden. Die Bindung erfolgte hier bei niedriger Salzkonzentration spezifisch an eine Anionenaustauschssäule. Die Elution fand bei hoher Salzkonzentration statt, so dass anschließend eine Präzipitation der DNA mit Isopropanol erforderlich war. Danach wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend

für 15 min bei 37° C im Brutschrank getrocknet, um Ethanolreste wieder vollständig zu entfernen. Zum Schluss wurde die DNA in 300 µl destilliertes H₂O aufgenommen.

2.2.1.5. PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION

Die DNA-Konzentration wurde bei Maxipräparationen photometrisch bestimmt. Dazu wurden die zu bestimmenden Nucleinsäurelösungen 1:100 in H₂O verdünnt und deren Extinktion bei 260 nm gegen einen Leerwert (Aqua bidest.) gemessen.

Bei einer doppelsträngigen DNA entspricht eine Extinktion von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml, bei Einzelstrang-DNA 33 µg/ml und bei RNA 40 µg/ml.

Der Quotient 260 nm/280 nm liefert eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA-Probe. Reine DNA weist einen Quotienten von 1,8 auf. Bei Verunreinigungen mit Protein liegen niedere Werte vor.

2.2.1.6. HORIZONTALE GELELEKTROPHORESE IM AGAROSEGEL

Die Methode der DNA-Gelelektrophorese trennt DNA-Moleküle im Agarosegel gemäß ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld auf.

Herstellung von Agarosegelen

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 1%-ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurden 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer für zwei Minuten gekocht. Nachdem die Temperatur des Agarosegels auf ca. 60° C abgekühlt war, wurde der Farbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugesetzt. Das in eine horizontale Wanne gegossene Agarosegel war nach ca. 30 min bei Raumtemperatur auspolymerisiert.

Durchführung

Nach Aufnahme der DNA-Proben in einfach Loading-Puffer wurden die DNA-Fragmente bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 80-120 mA für 30 min. im elektrischen Feld aufgetrennt. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA-Helix-Struktur und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht.

Somit werden die verschiedenen DNA Fragmente als Banden sichtbar, deren Länge sich anhand des mitaufgetragenen Molekulargewichts-Standards abschätzen lassen bzw. deren Dicke der Menge an DNA entspricht. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel während der UV-Belichtung fotografiert.

2.2.1.7. SCHNEIDEN VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

DNA-Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Nach Spaltung von Plasmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen kann die Länge der jeweils entstandenen linearen DNA-Fragmente durch eine anschließende Gelelektrophorese bestimmt und somit das Plasmid charakterisiert bzw. identifiziert werden. Dies ermöglichte die regelmäßige Kontrolle aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Jeweils 3,0 µl DNA aus dem Miniprep bzw. 1,0 µl DNA aus dem Maxiprep wurden mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* einzeln (Einzelrestriktionsverdau, s. Tab. 2), sowie mit *EcoRI*/*HindIII* in Kombination (Doppelveidau, s. Tab. 3) enzymatisch geschnitten. Die Reaktionsansätze wurden im Wasserbad bei 37° C für mindestens 30 min inkubiert. Die Proben wurden anschließend in einem 1%-iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Einzelrestriktionsverdau mit <i>HindIII</i> bzw. <i>BamHI</i>		
	DNA-Quelle	
	<i>Miniprep</i>	<i>Maxiprep</i>
DNA	3,0 µl	1,0 µl
Puffer B	1,5 µl	1,5 µl
<i>Hind III</i> bzw. <i>BamHI</i>	0,25 µl	0,25 µl
H ₂ O bidest.	10,25 µl	12,25 µl

Tab. 2: Einzelrestriktionsverdau mit *HindIII* bzw. *BamHI*

Doppelrestriktionsverdau mit <i>HindIII</i> und <i>BamHI</i>		
	DNA-Quelle	
	<i>Miniprep</i>	<i>Maxiprep</i>
DNA	3,0 µl	1,0 µl
Puffer B	1,5 µl	1,5 µl
<i>Hind III</i>	0,25 µl	0,25 µl
<i>EcoRI</i>	0,25 µl	0,25 µl
H ₂ O bidest.	10,0 µl	12,0 µl

Tab. 3: Doppelrestriktionsverdau mit *HindIII* und *BamHI*

2.2.1.8. SEQUENZIERUNG VON DNA

Mit der DNA-Sequenzierung können die Nukleotidabfolgen in einem DNA-Molekül bestimmt werden. Sie dient damit der Analyse der Primärstruktur der DNA.

Frederik Sanger entwickelte dafür die Didesoxymethode: Durch hohe Temperaturen ($> 90^{\circ}\text{C}$) wird der DNA-Doppelstrang in die zwei Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend wird mit Hilfe eines synthetischen Oligonukleotids (Primer) und einer DNA-Polymerase einer der beiden Komplementärstränge neu synthetisiert.

Das synthetisierte DNA-Stück hat durch den Primer einen definierten Anfangspunkt. Die Länge der einzelnen neu synthetisierten Fragmente ist allerdings variabel, da jeder Reaktionsansatz neben den Desoxynukleotiden (dNTPs) auch Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthält. Durch die fehlende 3'-OH-Gruppe des ddNTPs kann keine Phosphordiesterbindung zum nächsten Nukleotid aufgebaut werden. Somit verläuft die Kettenverlängerung nur so lange, bis ein ddNTP in den neu gebildeten Strang eingebaut wird und die Synthese abbricht. Somit enden in jedem Ansatz, je nach verwendetem dNTP, die Fragmente an einer bestimmten Basensorte. Wichtig ist es dabei, auf eine ausreichende Konzentration der ddNTP-Moleküle zu achten, damit statistisch an jeder Stelle der zu sequenzierenden DNA ausreichend Kettenbrüche stattfinden. Nach durchgeführter Polymerasereaktion erhält man verschieden lange DNA-Stränge, die in einem Acrylamidgel der Länge nach aufgetrennt werden. Aus diesem Gel kann dann direkt die Basensequenz abgelesen werden.

Sanger führt die Polymerisationsreaktion für jede Base einzeln in vier getrennten Ansätzen mit radioaktiv markierten ddNTPs durch. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine nach Sanger modifizierte Methode angewendet. Die ddNTPs sind im Gegensatz zur ursprünglichen Didesoxymethode nicht radioaktiv, sondern mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. In dieser Arbeit wurden mit Rhodamin-Farbstoffderivate markierte ddNTPs eingesetzt, wobei jede Base mit einer anderen Farbe markiert war. Die Reaktion konnte somit in einem Reaktionsansatz für alle vier Basen stattfinden, da die Unterscheidung bei der Analyse durch das unterschiedliche Fluoreszenzverhalten der endständigen ddNTP-Nukleotide geschieht.

Durchführung

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die PCR-Reaktion der verschiedenen Sequenzierungsätze (Tab. 4) wurde in einem Mastercycler (Fa. Eppendorf) nach dem Programmablauf CYCLESEQ (Tab. 5) durchgeführt.

Sequenzierungsansatz

Plasmid-DNA		0,5 - 1 µl
Primer	10 pmol/ul	1 µl
Ready Reaction Mix	Fa ABI Biosystems	2 µl
H2O bidest.		1 - 1,5 µl

Tab. 4: Sequenzierungsansatz für PCR

Sequenzierungsprogramm mit 30 Wiederholungen

	Temperatur [° C]	Zeit [s]
Denaturierung	96	15
Anealing	53	15
Elongation	60	240

Tab. 5: Sequenzierungsprogramm

Durch die anschließende DNA-Präzipitation wurden nicht eingebaute ddNTPs aus dem Ansatz entfernt:

Dazu wurde jeder Ansatz mit 12,5 µl 100%-igem Ethanol und 0,5 µl NaO-Acetat (3 M, pH=5,2) versehen und mit 14000 rpm für 20 min bei 4° C zentrifugiert. Anschließend wurden die entstandenen Pellets mit je 90 µl 70%-igen Ethanol gewaschen und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Dann wurde das Ethanol mit einer 100 µl-Pipette vorsichtig abgenommen, und die DNA-Pellets anschließend im Wärmeschrank bei 60° C getrocknet. Die Proben wurden dann mit dem Abi-Sequenzer (Fa. Medigenomix) analysiert und im Anschluß mit dem Computerprogramm SequenzAnalysis (Fa. ABI Biosystems) ausgewertet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle verwendeten Plasmide mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Dabei konnten keine Unterschiede zur Referenzsequenz festgestellt werden.

2.2.2. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.2.1. ZELLKULTUR

In dieser Arbeit wurden Zellen vom Typ HF1-D3-SV40 verwendet. Dabei handelt es sich um eine humane Fibroblastenzelllinie, welche mit dem SV40-Virus immortalisiert wurden.

Als Nährmedium für die Zellzucht wurde DMEM-Medium benutzt, welchem 10% Endkonzentration fetales Kalberserum (FCS) zugesetzt wurde. Die Lagerung des Mediums erfolgte bei einer Temperatur von 4° C.

Gezüchtet wurden die adhärent wachsenden Zellen in 75 cm³-Zellkulturflaschen. Diese wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C und einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Alle zwei Tage wurde das Nährmedium erneuert.

Gearbeitet wurde mit Zellkulturen grundsätzlich unter einem Laminar-Flow um sterile Bedingungen gewährleisten zu können.

2.2.2.2. GENERATIONSWECHSEL DER ZELLEN

Adhärenente Zellen sollen nur bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert werden. Bei Überschreiten dieser Wachstumsdichte wurden die Zellen von der Kulturschale gelöst, in Medium verdünnt und in neue Kulturschalen überführt. Dazu wurden zunächst die Zellen zweimal mit je 1 ml sterilem und 37° C warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärenent wachsenden Zellen mit 2 ml einer 37° C warmen Trypsinlösung benetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten im Brutschrank wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops kontrolliert, ob sich die Zellen ausreichend vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten. Über eine Pipettierhilfe wurden 8 ml 10%-FCS-DMEM-Nährmedium zugegeben und gut mit den Zellen vermischt. Die nun entstandene Zellsuspension wurde dann in neue Kulturflaschen überführt und jeweils auf 10 ml mit 10%-FCS-DMEM-Nährmedium aufgefüllt. Nicht benötigte Zellen wurden verworfen.

2.2.2.3. VORBEREITUNG DER ZELLEN FÜR MAGNETOFEKTIONSVERSUCHE

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche in den Abschnitten 3.1 und 3.2 wurden die Zellen aus den Kulturflaschen in 12-well-Kulturplatten überführt. Sollten die Zellen für anschließende Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendet werden, enthielt jedes well ein steriles Deckgläschen, auf dem die Zellen adhärenent anwuchsen. Um die gewünschte Zellzahl von 120000 Zellen pro well zu erhalten, wurden die abgelösten Zellen in eine Neubauer-Zählkammer überführt, unter dem Lichtmikroskop gezählt und mit folgender Formel das benötigte Verhältnis von Zellen und Medium bestimmt.

$$\text{Zahl der gezählten Zellen} \times 2,5 \times 1000 = [\text{Zellen/ml}]$$

$$[\text{Zellen/ml}] \times 1,5 \text{ ml} = [\text{IST}] \text{ (pro well 1,5 ml benötigt)}$$

2.2.2.4. MAGNETOFEKTION

Prinzipien

Die Magnetofektion ist eine sehr effiziente Methode, um adhärente Zellen in Kultur mit Plasmid-DNA zu transfizieren. Dies geschieht mit Hilfe des nichtviralen Transfektionsvektors PEI (Polyethylenimin) und daran gekoppelten Eisenoxidpartikeln unter Einfluß eines starken Stabmagneten (chemicell GmbH).

Durchführung

Zunächst wurde die DNA mit FCS-freien DMEM-Medium verdünnt. Dabei hatte sich eine DNA-Konzentration von 2,0 µg/ml am effizientesten erwiesen. In einem zweiten Ansatz wurden 24 µl PolyMAG in 6 ml DMEM-Medium (FCS frei) verdünnt. Anschließend wurden der DNA-Ansatz und PolyMAG-Ansatz vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachdem die Zellen zwei Mal mit 37° C warmen PBS gewaschen wurden, wurde der DNA-PolyMAG-Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Die 12-well-Kulturplatte mit den Fibroblasten und dem Transfektionsansatz wurde danach auf eine Magnetplatte gestellt und im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ für 15 min inkubiert. Durch das starke magnetische Feld haben sich die DNA-PolyMAG-Komplexe zu diesem Zeitpunkt sehr effizient an der Zelloberfläche angelagert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz abgesaugt, durch DMEM-Medium+FCS ersetzt, und die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Bevor die Zellen weiteren Arbeitsschritten zugeführt wurden (s. 2.2.3 und 2.2.4) wurde die Transfektionsrate anhand der Expression des gewünschten fluoreszierenden Proteins mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (s. 2.2.2.4) überprüft.

2.2.3. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.3.1. IMMUNPRÄZIPITATION

Prinzipien

Unter Immunpräzipitation versteht man die Ausfällung eines löslichen Antigens durch Antikörper.

Zur Immunpräzipitation werden mono- bzw. polyklonale Antikörper eingesetzt, welche mit ihren spezifischen Bindungsstellen an entsprechende Antigene binden können. Zusätzlich wird ProteinG zugesetzt, das an Sepharose oder Magnetpartikeln (Microbeads) gekoppelt ist. ProteinG bindet an Antikörper. Somit können die entstandenen Antigen-Antikörper-ProteinG-Komplexe im durch Zentrifugation oder im magnetischen Feld isoliert werden.

Durchführung

Im Anschluss an die Magnetofektion wurden die 12-well-Platten nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden aus dem Brutschrank entnommen und die Zellen zweimal mit 37° C warmen PBS-Puffer gewaschen.

Danach wurden die Zellen in Lyse-Puffer (100 µl pro well) für 30 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber vom Boden der 12-well-Platten gelöst und anschließend bei 14000 rpm für 20 Minuten bei einer Temperatur von 4° C zentrifugiert, um den Zellextrakt (Überstand) von unlöslichen Zellbestandteilen (Pellet) zu trennen.

120 µl des Zellextraktes wurden anschließend mit 1,5 µl des gewünschten Antikörpers versetzt und auf einem Schüttler im Kühlraum bei 4° C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 50 µl ProteinG-Microbeads zugegeben und für weitere 30 Minuten bei einer Temperatur von 4° C auf dem Schüttler inkubiert. Alternativ wurden Microbeads verwendet, welche direkt an die entsprechenden Antikörper gekoppelt waren.

Die zu isolierenden Proteine aus Protein-Antikörper-ProteinG-Komplexen wurden anschließend im magnetischen Feld eines Magnetständers (Fa. Miltenyi) an die entsprechenden Säulen (Fa. Miltenyi) laut Herstellerangaben gebunden und fünfmal mit je 1,0 ml PBS gewaschen. Zur anschließenden Denaturierung aller bestehenden Proteine bzw. Proteinkomplexe auf der Säule wurde die Probe mit 20 µl heißem (95°C) NuPage-LDS-Sample-Puffer (1x) für 5 min. inkubiert. Die Elution von der Säule er-

folgte durch Zugabe von weiteren 50 µl des 1x NuPage-LDS-Sample-Puffers. Anschließend wurden alle eluierten Proteine mittels PAGE und Westernblot weiter charakterisiert.

Quervernetzung mit DSP

Ditibis (succinimidyl) Propionat ist ein homobifunktioneller, durch Thioalkohol spaltbarer membrandurchlässiger Crosslinker. Dieser stabilisiert z.B. Protein-Protein Wechselwirkungen durch zusätzliche Ausbildung kovalenter Bindungen und wurde in dieser Arbeit bei der Suche nach Interaktionspartnern für PEX3 (s. 3.3) eingesetzt.

DSP enthält an beiden Enden einen Amin-reagierenden N-hydroxysuccinimide (NHS) Ester. NHS-Ester reagieren mit Primäraminen bei einem pH-Wert von 7,9 zu beständigen Amidverbindungen. Proteine und Antikörper besitzen im allgemeinen Primäramine, die als Ziele für NHS-Ester dienen.

Zunächst wurde DSP in DMSO gelöst und anschließend mit PBS zu einer 2,4 mM Lösung verdünnt. Nachdem die Zellen 30 min lang in dieser Lösung inkubiert wurden, erfolgte durch Zugabe von 200 µl 1 M TrisHCl (pH 8) der Reaktionsstopp. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und mittels Immunpräzipitation wie oben beschrieben analysiert. Allerdings mussten die Eluate, bevor sie der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zugeführt werden konnten, im Verhältnis 1:10 mit DTT (1 M) versetzt werden.

DTT löst die entstandenen Querverbindungen wieder und ermöglicht die Auftrennung der Proteine mittels PAGE.

2.2.3.2. POLYACRYLAMID-GELEKTROPHORESE (PAGE)

Prinzipien

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode zum Auftrennen von Molekülen, wie z.B. von Proteinen, im elektrischen Feld. Es existieren mehrere Varianten der PAGE. In dieser Arbeit kam ausschließlich die SDS-PAGE zum Einsatz.

Hierbei werden Proteine in der Gegenwart von SDS (Natriumdodecylsulfat) auf 95° C erhitzt, um ein Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen zu erreichen. Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Detergens, welches die Eigenladung von Molekülen überdeckt, und somit eine konstante Ladung für alle Proteine herbeiführt. Pro Gramm Protein binden 1,4 g SDS.

Das Anlegen einer elektrischen Spannung führt zu einer Migration negativ geladener Proteine durch das Gel. Proteine mit geringerem Molekulargewicht migrieren dabei schneller als solche mit hohem Molekulargewicht (Laemmli, 1970; Manning & Colon, 2004).

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine von der Firma Invitrogen etablierte Variante der SDS-PAGE, das „NuPAGE Gel System“, eingesetzt. Hierbei wurden fertig gegossene 4-12%-ige Bis-Tris-Gele verwendet. Die Probenvorbereitung mit NuPAGE LDS sample buffer und NuPAGE reducing reagent erfolgten entsprechend der Herstellerangaben. Die Elektrophorese wurde in einer mit MOPS SDS-Puffer gefüllten „XCell SureLock Mini-Cell“ Kammer (Invitrogen) bei konstanten 200 V für 40-50 min durchgeführt.

2.2.3.3. WESTERNBLOT

Prinzipien

Beim Westernblot werden die Proteine vom Polyacrylamid-Gel eluiert und auf eine Membran aus Nitrozellulose transferiert. Dies geschieht durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld. Dabei bleiben die „Muster“ der Elektrophorese, d.h. die Auftrennung der verschiedenen Proteine anhand ihres Molekulargewichts, erhalten. Gleichzeitig wird SDS, welches sich an die Proteine angelagert hat, ausgewaschen. Folglich können die Proteine wieder renaturieren und ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979).

Durchführung

Nach durchgeführter SDS-PAGE erfolgte der Westernblot mit Hilfe eines „XCell II Blot Moduls“ (Invitrogen) in einer mit „NuPAGE Transfer buffer“ gefüllten „XCell SureLock Mini-Cell“ Kammer (Invitrogen) bei konstanten 30 V und 250-400 mA für 60 min nach Herstellerangaben.

Prinzipien

Die Visualisierung der Proteine auf der Membran geschieht mit Hilfe der Immundetektion. Da die Proteine während des Westernblots partiell renaturieren, können diese anschließend von spezifischen Antikörpern erkannt werden. Zunächst müssen nach dem Westernblot die freien Protein-Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran mit Milchpulver oder BSA (bovine serum albumin) blockiert werden. Andernfalls würden die Antikörper unspezifisch an die Membran binden und hierbei einen spezifischen Antigennachweis verhindern.

Nach dem Blocken wird die Membran mit dem ersten Antikörper „Primär-Antikörper“ inkubiert. Dieser bindet spezifisch an das zu erkennende Zielprotein.

Danach entfernen stringente Waschschrte unspezifisch gebundene und ungebundene Antikörper von der Membran. Im nächsten Schritt wird die Membran mit dem zweiten Antikörper (Sekundär-Antikörper) inkubiert, der Bereiche des ersten Antikörpers erkennt und daran bindet. Die Visualisierung erfolgt nach weiteren Waschschrten mit Hilfe des Enzyms alkalische Phosphatase, das an den sekundären Antikörper kovalent gekoppelt ist.

Durchführung

Nach Ablauf des Westernblot wurde die Membran mit Blocklösung für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur, oder alternativ über Nacht im Kühlraum bei 4° C inkubiert. Zum Blocken kamen, je nach verwendetem Antikörper, 3%-iges BSA oder 5%-iges Milchpulver in TBS zum Einsatz (Tab. 6). Danach wurde die Membran einmal mit entsprechendem Inkubationspuffer (Tab. 6) gewaschen. Die Membran wurde anschließend zusammen mit 2 ml Inkubationspuffer für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurde der Inkubationspuffer verworfen und die Membran dreimal in Waschpuffer (Tab. 2) für je 5 min gewaschen. Danach wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Tab. 7) für weitere 60 min bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten mit TBS+Tween20 wurde die Membran für 5 min in AP-Detektionspuffer bei RT alkalisiert. Zur Detektion des sekundären Antikörpers wurde die Membran mit dem AP-Substrat CDP-Star (Roche, Verdünnung 1:100 in AP-Detektionspuffer) für 5 min bei RT inkubiert. Bei der Spaltung des Substrates durch die AP wird hierbei Licht emittiert, welches anhand eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilms

detektiert werden konnte Der Film musste dazu, je nach Signalstärke, für 5 min bis zu mehreren Stunden belichtet werden.

Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Inkubationspuffer	Block-Lösung	Waschpuffer
Anti-HA	Rat	1:1000 in 5% Milchpulver	5% Milchpulver	TBS+Tween20
Anti-GFP	Mouse	1:1000 in 5% Milchpulver	5% Milchpulver	TBS+Tween20
Anti-myc	Mouse	1:5000 in 1% BSA	3% BSA	TBS
Anti-his	Mouse	1:1000 in 5% Milchpulver	5% Milchpulver	TBS

Tab. 6: Verwendete primäre Antikörper

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Waschpuffer
Anti-Mouse	1:7500 in 10% Milchpulver	TBS+0,5%Tween20
Anti-Rat	1:2500 in 10% Milchpulver	TBS+0,5%Tween20

Tab. 7: Verwendete sekundäre Antikörper

Redetektion („Strippen“)

Die Redetektion ermöglicht es, dass Membranen, die bereits mit primären bzw. sekundären Antikörpern immundetektet wurden, nochmals mit einer weiteren Antikörperkombination inkubiert werden können.

Um den vorher gebundenen AK zu entfernen, wurden die Membranen 15 min lang in Stripping-Puffer bei einer Temperatur von 55° C auf einem Schüttler inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des Stripping-Puffers folgten drei Waschschrte mit TBS-T für je 15 min bei 55° C. Anschließend wurde die Membran wieder der Blocklösung zugeführt und der oben beschriebenen Prozedur unterzogen.

2.2.4. FLUORESCENZ-SPEKTROSKOPISCHE METHODEN

2.2.4.1. FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)

Physikalisches Prinzip

Beim FRET wird die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffes (Donor-Fluorophor) auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen. Die Energie des Donor-Fluorophors wird dabei nicht in Form von Fluoreszenz abgegeben, sondern strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf den fluoreszierenden Akzeptor übertragen. Eine der Grundvoraussetzungen für FRET ist, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt, wie es bei z.B. CFP und YFP der Fall ist (Tab. 8). Des Weiteren müssen Donor und Akzeptor eine parallele Schwingungsebene besitzen und dürfen nur wenige Nanometer voneinander entfernt liegen (Lakowicz *et al.*, 1998). FRET kann über eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz oder über eine Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz detektiert werden.

	Absorption max. [nm]	Emission max. [nm]
pECFP	433	475
PEYFP	513	527

Tab. 8: Absorptions- und Emissionsmaxima von pECFP und pEYFP

Nachweis der Interaktion von Proteinen

Mit Hilfe von FRET können Interaktionen zwischen Proteinen nachgewiesen werden. Das erste Protein wird dabei an einen Donor-Fluorophor, das zweite Protein an einen Akzeptor-Fluorophor gekoppelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das FRET-Paar CFP und YFP eingesetzt. Sind die Grundkriterien (s. oben) erfüllt, so entsteht ein FRET-Signal, sobald sich beide Moleküle in einem räumlich hinreichend engen Abstand befinden. Dabei ist die FRET-Effizienz umso höher, je näher zwei Proteine zusammen liegen (Lakowicz *et al.*, 1998).

Durchführung

Zunächst wurde wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben eine Magnetofektion mit CFP- bzw. YFP-kodierenden Plasmiden durchgeführt. Nach Inkubation im Brutschrank über Nacht wurde die 12-well-Platte mit den Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden dann 100 µl Trypsin pro well zugegeben und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml PBS/well gestoppt, die abgelösten Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (500 RCF). Das Zell-Pellet wurde anschließend in 1 ml PBS gewaschen und erneut für 5 min bei 4° C zentrifugiert (500 RCF). Die so gewonnenen intakten und noch lebenden Zellen wurden anschließend in 100 µl PBS resuspendiert und in einem Fluoreszenzspektrometer *in vivo* vermessen.

Nach Anregung bei 513 nm wurde ein Emissionsspektrum (520 nm-550 nm in 1 nm Schritten) aufgezeichnet. Eine charakteristische maximale Emission bei 527 nm belegt die Expression des Akzeptor-Fluorophors YFP.

Anschließend wurde ein CFP Emissions-Spektrum (450-550 nm in 1 nm Schritten) gemessen. Bei einer Anregungsenergie der Wellenlänge 433 nm zeigt CFP seine maximale Emission bei 475 nm (Tab. 8). Da der Emissionsbereich von CFP (475 nm) nahe dem Excitationsmaximum von YFP (513 nm) liegt,

wird Energie strahlungslos von CFP auf YFP übertragen, Das auf diese Weise angeregte YFP zeigt dann die maximale Emission bei einer Wellenlänge von 527 nm.

Die Auswertung erfolgte mit der zum Utrassspec1000 zugehörigen Software.

2.2.4.2. FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Physikalisches Prinzip

Im zu untersuchenden Präparat befinden sich fluoreszierende Farbstoffe, die durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei wird Licht emittiert, welches langwelliger ist als das anregende Licht (Tab. 8). Hierzu wird die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendige Wellenlänge mit optischen Filtern isoliert, und anschließend auf das Objekt geleitet. Dieses beginnt zu fluoreszieren, und emittiert langwelligeres Licht, das erneut durch einen optischen Filtern isoliert und dann durch das Objektiv gesammelt wird. In dieser Arbeit wurden adhärent wachsende CFP- bzw YFP-exprimierende Fibroblasten in PBS-Puffer direkt in der Kulturschale fluoreszenzmikroskopisch *in vivo* untersucht. Dazu wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss) mit angeschlossener Digitalkamera (Fa. Zeiss) eingesetzt. Die Aufnahmen wurden mit der Software Axiovision (Fa. Zeiss) bearbeitet.

3. ERGEBNISSE

3.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR HOMO- UND HETERODIMERISIERUNG DER PEROXISOMALEN ABC-HALBTRANSPORTER ABCD4 UND ABCD1

ABC-Transporter sind Transmembranproteine, die für den aktiven Transport einer Vielzahl von biologischen Substanzen durch die Membran verantwortlich sind. ABC-Halbtransporter bilden als Dimere funktionelle biologische Einheiten. Es wurden bis jetzt vier ABC-Halbtransporter beschrieben. Die in der peroxisomalen Membran lokalisierten Halbtransporter ABCD1, ABCD2 und ABCD3 (Dean *et al.*, 2001), und das ER-Protein ABCD4 (Kashiwayama *et al.*, 2009). Für die peroxisomalen Halbtransporter ABCD1, ABCD2 und ABCD3 ist nachgewiesen, dass sie in der Lage sind, Homo- und Heterodimere zu bilden (Hillebrand *et al.*, 2007; Holzinger *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; van Roermund *et al.*, 2008). Deshalb lag die Vermutung nahe, dass auch der Halbtransporter ABCD4 mit sich selbst Homodimere bildet. Diese Homodimerisierung sollte in den folgenden Versuchen bestätigt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob ABCD4 auch Heterodimere mit dem phylogenetisch verwandten ABCD1 bilden kann.

Dazu sollte ein Immunpräzipitations-Verfahren entwickelt und angewandt werden, in dem ABCD1- bzw. ABCD4-Proteinvarianten verwendet werden, deren N-Terminus mit einem YFP-Peptid bzw. HA-Peptid fusioniert wurde.

Protein-Protein-Komplexe aus den so entstandenen YFP-„tagged“ bzw. HA-„tagged“ Proteinen konnten auf diese Weise mit einem entsprechenden anti-YFP-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend biochemisch im Westernblot mit anti-YFP- bzw. anti HA-Antikörpern identifiziert werden (s. 2.2.3.3). Ein weiterer Vorteil der fluoreszierenden Fusionsproteine ist, dass deren Expression vor Beginn der biochemischen Untersuchungen *in vivo* in den Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden konnte. Somit konnte sichergestellt werden, dass eine ausreichende Anzahl von Zellen erfolgreich transfiziert wurde (Abb. 5).

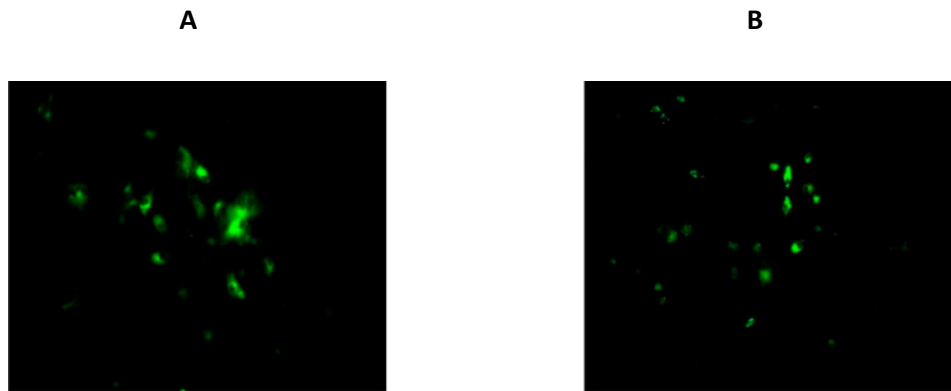


Abb. 5: Expression der ABC-Transporter-Fusionsproteine ABCD4-YFP und ABCD1-YFP in humanen Fibroblasten. Humane Fibroblasten wurden mit ABCD1-YFP (A) bzw. ABCD4-YFP (B) cDNA transfiziert und nach 24 h fluoreszenzmikroskopisch *in vivo* untersucht. Nach Anregung bei 513 nm gibt dabei das an die ABC-Transporter gekoppelte YFP-Protein ein grün fluoreszierendes Signal mit einem Emissionsmaximum von 527 nm ab.

3.1.1. HOMODIMERISIERUNG ABCD1-ABCD1

Zur Verifizierung der Methode sollte zunächst die in der Literatur beschriebene Homodimerisierung von ABCD1 (Liu *et al.*, 1999; Hillebrand *et al.*, 2007; van Roermund *et al.*, 2008) bestätigt werden.

Dazu wurden zwei Plasmide, welche die cDNA für ein ABCD1-YFP bzw. ein ABCD1-HA enthielten, mittels Magnetofektion (s. 2.2.2.4) in humane Fibroblasten co-transfiziert. Die nach 24 h gewonnenen Zellextrakte wurden mit anti-YFP-Antikörpern und ProteinG-magnetic beads inkubiert. Solubilisierete ABCD1-YFP-ABCD1-HA-Proteinkomplexe wurden anschließend im magnetischen Feld gebunden und mit Puffer gewaschen. Die so isolierten Proteinkomplexe wurden dann mittels Polyamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt und im nachfolgenden Westernblot (s. 2.2.3.3) mit anti-YFP bzw. anti-HA Antikörper analysiert (Abb. 6). Fünf Prozent des solubilisierten Zellextrakts wurden als Expressions-Kontrolle analog analysiert (Abb. 6). Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 102 kDa (ABCD1: 75 kDa + YFP: 27 kDa) bzw. ca. 76 kDa (ABCD1: 75 kDa + HA 1 kDa) belegen, dass beide Fusionsproteine erfolgreich exprimiert und solubilisiert werden konnten. Auch im Eluat des Immunpräzipitats konnten beide Fusionsproteine nachgewiesen werden. Somit wurde ABCD1-YFP erfolgreich an die magnetic beads gebunden. Gleichzeitig konnte auch das ABCD1-HA Protein nachgewiesen werden. Das ABCD1-HA Protein kann jedoch nur bei einer Komplexbildung zwischen ABCD1-YFP und ABCD1-HA mit an die magnetic beads gebunden werden. Eine unspezifische Bindung von ABCD1-HA an YFP allein (d.h. nicht in Fusion mit einem ABC-Transporter) konnte ausgeschlossen werden (s. 3.1.2). Somit wurde die bereits bekannte Homodimerisierung des peroxisomalen Halbtransporters ABCD1 durch Immunpräzipitation bestätigt.

In diesen Experimenten wurde eine ABCD1 Proteinvariante verwendet, an deren N-Terminus ein relativ großes YFP-Protein (27 kDa) fusioniert wurde. Das aus der Sequenz YPYDVPDYA bestehende N-terminale HA-Epitop des anderen Interaktionspartners ABCD1-HA ist im Vergleich zu YFP sehr klein (ca. 1 kDa). Die Interaktion zwischen beiden Proteinen zeigt, dass N-terminales YFP bzw. HA die Homodimerisierung von ABCD1 sterisch nicht stört. Somit wurden für die folgenden Experimente weiterhin peroxisomale ABC-Halbtransporterproteinvarianten verwendet, deren N-Terminus mit YFP oder HA fusioniert wurde.

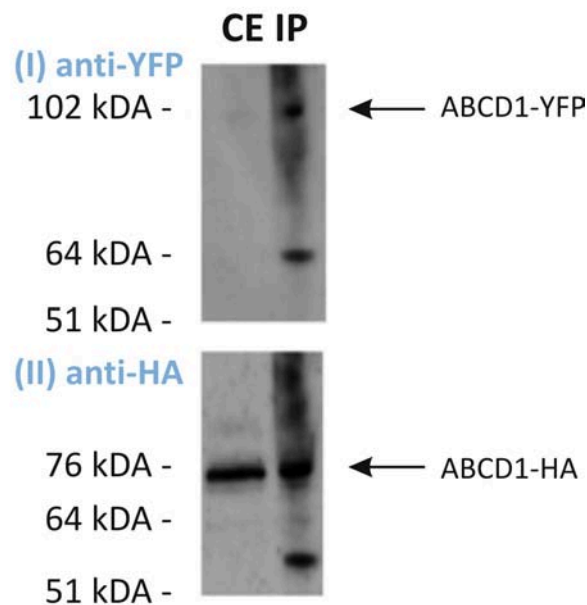


Abb. 6: Homodimerisierung von ABCD1. ABCD1-YFP und ABCD1-HA wurden in humane Fibroblasten cotransfiziert. Solubilisierter Protein-komplexe wurden mittels anti-YFP-Antikörper und ProteinG-magnetic beads aus den Zellextrakten isoliert und anschließend mittels PAGE und Westernblot auf das Vorhandensein von ABCD1-YFP mit antiYFP-Antikörpern (I) bzw. auf das Vorhandensein von ABCD1-HA mit anti-HA-Antikörpern (II) getestet. ABCD1-YFP und ABCD1-HA konnten in den gewonnenen Zellextrakten (CE) 24 h nach Transfektion identifiziert werden. Da in den isolierten Proteinkomplexen (IP) sowohl ABCD1-YFP (Abb. I) als auch ABCD1-HA (Abb. II) nachgewiesen werden konnte, bildet der ABC-Halbtransporter ABCD1 ein Homodimer. Das Molekulargewicht ist links in kDa angezeigt.

3.1.2. NEGATIVKONTROLLE YFP MIT ABCD1-HA/ABCD4-HA

YFP, welches über ein Molekulargewicht von 26,9 kDa verfügt, ist ein relativ großes Protein. Somit wäre es theoretisch möglich, dass die Proteinkomplexbildung nicht direkt zwischen den ABC-Halbtransportern zustande kommt, sondern, dass YFP allein an die peroxisomalen ABC-Transporter bindet. Als Kontrolle wurden daher Immunisolate aus Zellextrakten hergestellt, die YFP allein (ohne ABCD1- bzw ABCD4- Fusionsproteinanteil) exprimieren.

Plasmide, kodierend für YFP und ABCD4-HA (Abb. 7 Spalten 1 und 2) bzw. ABCD1-HA cDNA (Abb. 7 Spalten 3 und 4) wurden in humane Fibroblasten cotransfiziert.

Mit Hilfe von anti-YFP-Antikörpern und der ProteinG-magnetic beads gelang es, YFP aus dem Zellextrakt zu isolieren. Dies zeigt die Immunpräzipitat-Bande im Bereich von ca. 27 kDa. Der Zellextrakt (CE) wurde als Expressions-Kontrolle mit aufgetragen (Abb. 7/I).

Mit Hilfe des HA-Antikörpers wurden nur ABCD4-HA bzw. ABCD1-HA im Zellextrakt anhand der Bande im Bereich von ca. 69 kDa bzw. 76 kDa nachgewiesen, aber nicht in den Immunisolaten (Abb. 7/II). Somit wird zwar ABCD4-HA bzw. ABCD1-HA in den Zellen exprimiert, es kommt aber nicht zu einer Proteinkomplexbildung mit YFP. Auch binden ABCD1-HA bzw. ABCD4-HA nicht unspezifisch an die Magnetbeads. Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass die oben beschriebenen Homodimerisierungen alleine über die peroxisomalen ABC-Transporter und nicht über den YFP-Proteintag zustande gekommen sind.

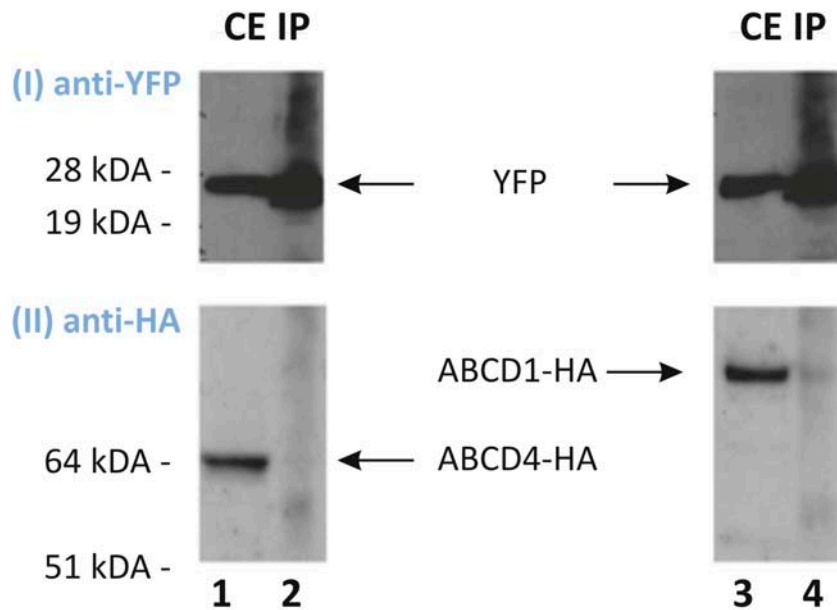


Abb. 7: Immunoisolation von YFP. YFP und ABCD1-HA bzw. ABCD4-HA cDNA wurden in humane Fibroblasten cotransfiziert. Solubilisierter Proteine wurden mittels antiYFP-Antikörper und ProteinG-magnetic beads aus den Zellextrakten isoliert und anschließend mittels PAGE und Westernblot auf das Vorhandensein von YFP mit anti-YFP-Antikörpern (I) bzw. auf das Vorhandensein von ABCD4-HA bzw. ABCD1-HA mit anti-HA-Antikörpern (II) getestet. Solubilisierter YFP und ABCD1-HA bzw. ABCD4-HA konnten in den Zellextrakten (CE) identifiziert werden. Da in den Immunisolaten (IP) nur YFP, aber nicht ABCD1-HA bzw. ABCD4-HA nachweisbar sind, binden beide ABC-Halbtransporter weder an YFP, noch unspezifisch an die Magnetbeads. Das Molekulargewicht ist links in kDa angezeigt.

3.1.3. HOMODIMERISIERUNG ABCD4-ABCD4

In einem nächsten Schritt sollte die Homodimerisierung von ABCD4 untersucht werden. Dazu wurden wiederum zwei Plasmide, welche die cDNA für ABCD4-YFP bzw. ABCD4-HA enthielten, mittels Magnetofektion (s. 2.2.2.4) in humane Fibroblasten co-transfiziert und nach 24 h wurden die gewonnenen Zellextrakte mit anti-YFP-Antikörpern und ProteinG-magnetic beads inkubiert. Solubilisierter ABCD1-YFP-ABCD4-HA-Proteinkomplexe wurden mit Hilfe eines magnetischen Felds isoliert und anschließend mittels PAGE (s. 2.2.3.2) im elektrischen Feld aufgetrennt und im folgenden Westernblot (s. 2.2.3.3) analysiert.

Die im Proteinkomplex vorhandenen ABCD4-YFP und ABCD4-HA Proteine konnten anschließend mittels spezifischer anti-YFP- bzw. anti-HA-Antikörpern eindeutig identifiziert werden (Abb. 8).

Nach Inkubation mit anti-YFP (I) zeigt der Westernblot eine Immunpräzipitat-Bande (IP) im Bereich von ca. 95 kDa (ABCD4: 69 kDa + YFP: 27 kDa). Damit zeigte sich, dass ABCD4-YFP Proteine erfolgreich aus den Zellextrakten mittels anti-YFP-Magnetbeads isoliert werden konnten. Der Zellextrakt

wurde als Kontrolle mit aufgetragen, um sicher zu gehen, dass ABCD4-YFP in der Zelle exprimiert wurde.

Gleichzeitig konnten auch ABCD4-HA Proteine nachgewiesen werden, die Detektion letzterer erfolgte durch den Einsatz eines anti-HA-Antikörpers. Nach Zugabe von anti-HA weist eine Bande von ca. 70 kDa (ABCD4: 69 kDa + HA: 1 kDa) im Zellextrakt auf die Expression von ABCD4-HA hin. Da auch im Immunpräzipitat (IP) ABCD4-HA nachgewiesen werden konnte, muss eine Komplexbildung zwischen ABCD4-YFP und ABCD4-HA erfolgt sein, da ABCD4-HA nicht an YFP allein binden kann (vgl. 3.1.2).

Hiermit konnte die Homodimerisierung des peroxisomalen ABC-Halbtransporters ABCD4 erstmals nachgewiesen werden.

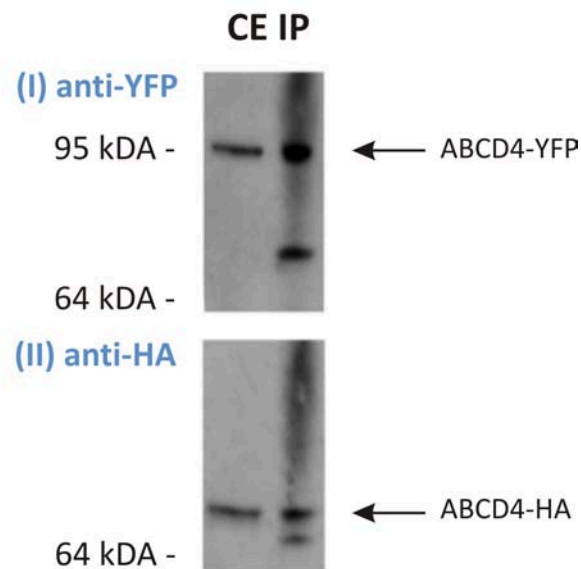


Abb. 8: Homodimerisierung von ABCD4. ABCD4-YFP und ABCD4-HA cDNA wurden in humane Fibroblasten cotransfiziert. Solubilisierte Proteinkomplexe wurden mittels anti-YFP-Antikörper und ProteinG-magnetic beads aus den Zellextrakten isoliert und anschließend mittels PAGE und Westernblot auf das Vorhandensein von ABCD4-YFP mit antiYFP-Antikörpern (I) bzw. auf das Vorhandensein von ABCD4-HA mit anti-HA-Antikörpern (II) getestet. ABCD4-YFP und ABCD4-HA konnten in den gewonnenen Zellextrakten (CE, Abb. I und II) 24 h nach Transfektion identifiziert werden. Da in den isolierten Proteinkomplexen (IP) sowohl ABCD4-YFP (Abb. I) als auch ABCD4-HA (Abb. II) nachgewiesen werden konnte, bildet der ABC-Halbtransporter ABCD4 ein Homodimer. Das Molekulargewicht ist links in kDa angezeigt.

A) Nachweis der Heterodimerisierung von ABCD4 und ABCD1 durch Immunisolation von ABCD4-haltigen Proteinkomplexen

Zum Nachweis der Heterodimerisierung von ABCD4 und ABCD1 wurde analog zu den vorherigen Versuchen vorgegangen.

Es wurden zwei Plasmide, welche die cDNA für ein ABCD4-YFP bzw. ein ABCD1-HA enthielten, mittels Magnetofektion (s. 2.2.2.4) in humane Fibroblasten co-transfiziert. Die nach 24 h gewonnenen Zell-extrakte wurden mit anti-YFP-Antikörpern und ProteinG-magnetic beads inkubiert. Solubilisierte ABCD4-YFP-ABCD1-HA-Proteinkomplexe wurden anschließend im magnetischen Feld gebunden und mit Puffer gewaschen. Die so gewonnenen Proteinkomplexe wurden dann mittels PAGE (s. 2.2.3.2) im elektrischen Feld aufgetrennt und im nachfolgenden Westernblot (s. 2.2.3.3) mit anti-YFP bzw. anti-HA Antikörper analysiert (Abb. 9).

Fünf Prozent des solubilierten Zellextrakts (CE) wurden als Expressions-Kontrolle analog analysiert (Abb. 9). Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 96 kDa (ABCD4: 69 kDa + YFP: 27 kDa) bzw. ca. 76 kDa (ABCD1: 75 kDa + HA 1 kDa) belegen, dass beide Fusionsproteine erfolgreich exprimiert und solubilisiert werden konnten.

Auch im Eluat des Immunpräzipitats (IP) konnten beide Fusionsproteine nachgewiesen werden. Somit wurde ABCD4-YFP erfolgreich an die Magnetbeads gebunden. Gleichzeitig konnte auch das ABCD1-HA Protein nachgewiesen werden. Das ABCD1-HA Protein kann aber nur bei einer Komplexbildung zwischen ABCD4-YFP und ABCD1-HA mit an die Magnetbeads gebunden werden. Eine mögliche Interaktion der Proteine über den YFP-Proteintag wurde unter 3.1.2 bereits ausgeschlossen. Somit konnte die Heterodimerisierung von ABCD1 und ABCD4 durch Immunisolation von ABCD4-haltigen Proteinkomplexen bestätigt werden.

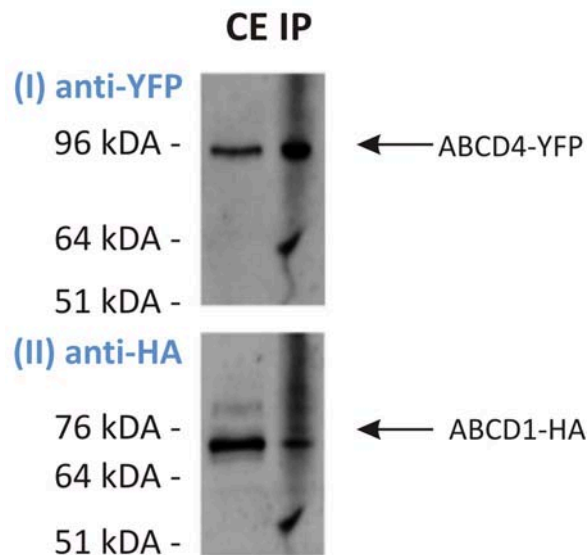


Abb. 9: Heterodimerisierung von ABCD4 und ABCD1. ABCD4-YFP und ABCD1-HA wurden in humane Fibroblasten cotransfiziert. Solubilisier- te Proteinkomplexe wurden mittels anti-YFP-Antikörper und ProteinG-magnetic beads aus den Zellextrakten isoliert und anschließend mittels PAGE und Westernblot auf das Vorhandensein von ABCD4-YFP mit anti-YFP-Antikörpern (I) bzw. auf das Vorhandensein von ABCD1- HA mit anti-HA-Antikörpern (II) getestet. ABCD4-YFP und ABCD1-HA konnten in den gewonnenen Zellextrakten (CEI) 24 h nach Transfektion identifiziert werden. Da in den isolierten Proteinkomplexen (IP) sowohl ABCD4-YFP (I) als auch ABCD1-HA (II) nachgewiesen werden konn- te, bilden die ABC-Halbtransporter ABCD4 und ABCD1 ein Dimer. Das Molekulargewicht ist links in kDA angezeigt.

B) Nachweis der Heterodimerisierung von ABCD4 und ABCD1 durch Immunisolierung von ABCD1- haltigen Proteinkomplexen

Um die gewonnenen Ergebnisse der oben beschriebenen Heterodimerisierung abzusichern, wurden weitere Versuche durchgeführt.

Diesmal sollte jedoch nicht ABCD4-YFP, sondern ABCD1-YFP mittels YFP-Antikörper immunisoliert werden.

Dazu wurden zwei Plasmide, welche die cDNA für ABCD1-YFP bzw. ABCD4-HA enthielten, mittels Magnetofektion (s. 2.2.2.4) in humane Fibroblasten cotransfiziert und nach 24 h wurden die gewon- nenen Zellextrakte mit anti-YFP-Antikörpern und ProteinG-magnetic beads inkubiert. Solubilisier- te ABCD1-YFP-ABCD4-HA-Proteinkomplexe wurden mit Hilfe eines magnetischen Felds isoliert und an- schließend mittels Polyamidgelelektrophorese (PAGE, s. 2.2.3.2) im elektrischen Feld aufgetrennt und im nachfolgenden Westernblot (s. 2.2.3.3) analysiert.

Die im Proteinkomplex vorhandenen ABCD1-YFP und ABCD4-HA Proteine konnten anschließend mit- tels spezifischer anti-YFP- bzw. anti-HA-Antikörpern eindeutig identifiziert werden (Abb. 10).

Fünf Prozent des solubilisierten Zellextrakts (CE) wurden als Expressions-Kontrolle analog analysiert (Abb. 10). Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 102 kDa (ABCD1: 75 kDa + YFP: 27 kDa) bzw. ca. 70 kDa (ABCD4: 69 kDa + HA 1 kDa) belegen, dass beide Fusionsproteine erfolgreich exprimiert und solubilisiert werden konnten.

Auch im Eluat des Immunpräzipitats (IP) konnten beide Fusionsproteine nachgewiesen werden. Somit wurde ABCD1-YFP erfolgreich an die magnetic beads gebunden. Gleichzeitig konnte auch das ABCD4-HA Protein nachgewiesen werden. Das ABCD4-HA Protein kann aber nur bei einer Komplexbildung zwischen ABCD1-YFP und ABCD4-HA mit an die Magnetbeads gebunden werden.

Eine mögliche Interaktion der Proteine über den YFP-Proteintag wurde unter 3.1.2 bereits ausgeschlossen. Somit konnte die Heterodimerisierung von ABCD1 und ABCD4 durch Immunisolierung von ABCD1-haltigen Proteinkomplexen nochmals bestätigt werden.

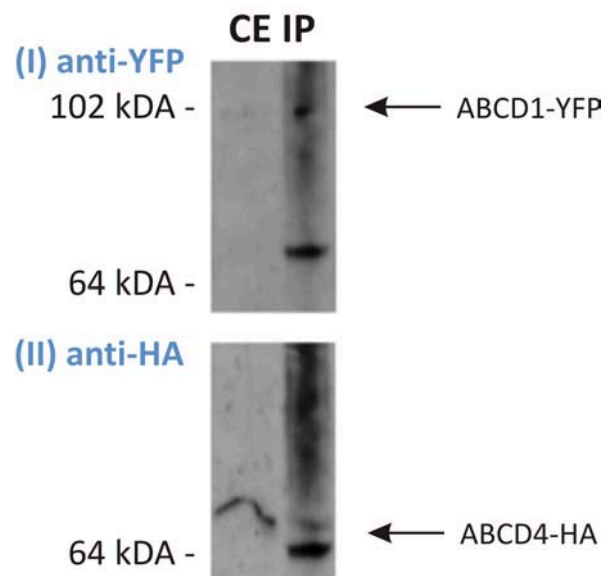


Abb. 10: Heterodimerisierung von ABCD1 und ABCD4. ABCD1-YFP und ABCD4-HA wurden in humane Fibroblasten cotransfiziert. Solubilisierete Proteinkomplexe wurden mittels anti-YFP-Antikörper und ProteinG-magnetic beads aus den Zellextrakten isoliert und anschließend mittels PAGE und Westernblot auf das Vorhandensein von ABCD1-YFP mit anti-YFP-Antikörpern (I) bzw. auf das Vorhandensein von ABCD4-HA mit anti-HA-Antikörpern (II) getestet. ABCD1-YFP und ABCD4-HA konnten in den gewonnenen Zellextrakten (CE) 24 h nach Transfektion identifiziert werden. Da in den isolierten Proteinkomplexen (IP) sowohl ABCD1-YFP(I) als auch ABCD4-HA (II) nachgewiesen werden konnte, bilden die ABC-Halbtransporter ABCD1 und ABCD4 ein Heterodimer. Das Molekulargewicht ist links in kDa angezeigt.

3.2. CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTION VON PEX19 MIT DEM PEROXISOMALEN MEMBRANPROTEIN PEX26

Essentielle Bedeutung in der peroxisomalen Membranbiogenese kommt dem farnesyliertem Peroxin PEX19 zu, welches als zytosolischer Rezeptor für peroxisomale Membranproteine deren Einbau in die peroxisomale Membran koordiniert (Götte *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 2000).

Es konnten bereits Interaktionen von PEX19 mit den humanen peroxisomalen Membranproteinen PEX2, PEX3, PEX10, PEX11 α , PEX11 β , PEX12, PEX13, PEX14, PMP22, PXMP4, SLC25A17 (Sacksteder *et al.*, 2000), sowie mit den ABC-Halbtransportern ABCD1, ABCD2, ABCD3 und ABCD4 nachgewiesen werden (Glöckner, 2001). Darüber hinaus interagiert PEX19 mit dem Peroxin PEX26 (Halbach *et al.*, 2006). Dieses aus 305 Aminosäuren bestehende integrale Membranprotein ist mit einem Transmembransegment in der peroxisomalen Membran verankert (Halbach *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2003a). PEX26 ist ebenfalls am peroxisomalen Proteinimport beteiligt und ist somit ebenfalls essentiell für die peroxisomale Biogenese (Matsumoto *et al.*, 2003b). Die Protein-Protein Interaktion beider Peroxine sollte mit Hilfe der folgenden Experimente näher charakterisiert werden.

3.2.1. BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION VON PEX19 UND PEX26

Zunächst sollte die im Abschnitt 3.1 für die peroxisomalen ABC-Halbtransporter etablierte Immunpräzipitationsmethodik von YPF-Fusionsproteinen auf die schon beschriebene PEX19-PEX26 Proteinwechselwirkung (Halbach *et al.*, 2006) angewandt werden. Des Weiteren sollte die Region von PEX26 näher charakterisiert werden, welche an PEX19 bindet. Dazu wurden die *PEX26*-cDNA in mehrere Abschnitte unterteilt und mit *YFP*-cDNA fusioniert (Abb. 11). Das Konstrukt YFP-(aa1-211)PEX26 kodiert für den N-terminalen Abschnitt von PEX26 (Aminosäuren 1 bis 211). Das Plasmid YFP-(aa212-305)PEX26 hingegen codiert für das C-terminale Drittel des Proteins, welches auch das postulierte Transmembransegment von PEX26 (aa252-269) enthält. Die Konstrukte YFP-(aa225-305)PEX26 und YFP-(aa242-305)PEX26 grenzen den C-terminalen Bereich noch näher ein (Abb. 11).

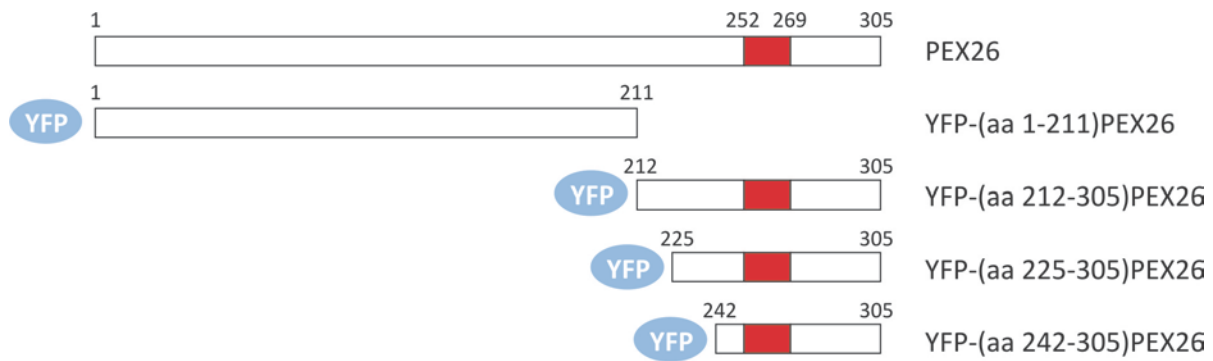


Abb. 11: Schematische Darstellung verschiedener PEX26-Fusionsproteine mit YFP. Der AS-Abschnitt 252-269 (rot) im C-terminalen Bereich markiert das postulierte Transmembransegment von PEX26.

Die Plasmide, die für die verschiedenen *YFP-PEX26*-Varianten kodieren, wurden jeweils mit dem Plasmid HA-PEX19 in humane Fibroblasten co-transfiziert (s. 2.2.2.4). Die nach 24 h gewonnenen Zellextrakte wurden auf Expression von HA-PEX19 bzw. YFP-PEX26 im Westernblot getestet (Gel nicht gezeigt). 95% des Zellextrakts wurden dann mit Anti-YFP Antikörpern und ProteinG-magnetic beads inkubiert. Solubilisierte YFP-PEX26-HA-PEX19-Proteinkomplexe konnten somit im magnetischen Feld gebunden und aus dem Zellextrakt isoliert werden (s. 2.2.3.1). Die gewonnenen Proteinkomplexe wurden im Anschluß daran mittels PAGE (s. 2.2.3.2) und Westernblot (s. 2.2.3.3) analysiert.

Sämtliche YFP-PEX26-Varianten konnten mit Hilfe der Anti-YFP-magnetic beads erfolgreich aus dem Zellextrakt isoliert werden (Abb. 12). Wurden die PEX26-Proteinvarianten aa212-305, aa225-305 und aa242-305 an die magnetic beads gebunden, dann konnte auch PEX19-HA-Protein im Eluat der Immunisolierung nachgewiesen werden. Somit bindet PEX19 an diese PEX26 Varianten. Bei Immunisolierung der Proteinvariante YFP-(aa1-211)PEX26 konnte HA-PEX19 nicht nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass PEX19 nicht an den N-Terminus (aa1-211) von PEX26 bindet (Abb. 12).

Somit konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen Aminosäuren aa242-305 von PEX26 ausreichen, um an PEX19 zu binden.

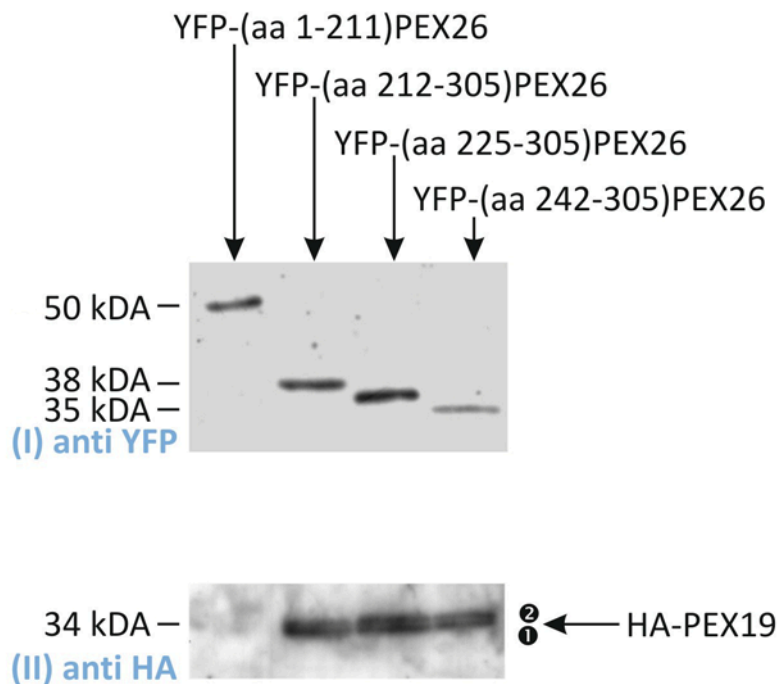


Abb. 12: Co-Immunisolation von HA-PEX19 mit verschiedenen YFP-PEX26 Varianten. Die cDNA verschiedener YFP-PEX26-Varianten und von HA-PEX19 wurde in humane Fibroblasten cotransfiziert. Solubilisierter Proteinkomplex wurde mittels anti-YFP-Antikörper und ProteinG-magnetic beads aus den Zellextrakten isoliert und anschließend mittels PAGE und Western blot auf das Vorhandensein von YFP-PEX16 mit anti-YFP-Antikörpern (I) bzw. auf das Vorhandensein von HA-PEX19 mit anti-HA-Antikörpern (II) getestet. In isolierten Proteinkomplexen von YFP-(aa212-305)PEX26, YFP-(aa225-305)PEX26 und YFP-(aa242-305)PEX26 konnte zusätzlich HA-PEX19 identifiziert werden (es erscheint je eine Bande im unteren Western blot), für YFP-(aa1-211)PEX26 dagegen nicht. (1=PEX19 unfarnesyliert, 2=PEX19 farnesyliert)

3.2.2. UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION VON PEX 26 MIT VERSCHIEDENEN PEX 19-DOMÄNEN MITTLES FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)

Im Rahmen der folgenden Untersuchungen sollte mit Hilfe von Fluorescence resonance energy transfer (FRET) die Region von PEX19 identifiziert werden, die mit PEX26 interagiert. Diese Methode bietet sich zum Nachweis dieser Protein-Proteinwechselwirkung besonders an, da im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass YFP-(aa242-305)PEX26 an PEX19 bindet. Dieses YFP-PEX26 Fusionsprotein konnte nun mittels FRET auf Interaktion mit verschiedenen CFP-PEX19-Proteinvarianten getestet werden. Da der Emissionsbereich des CFP-Proteins nahe dem Anregungsmaximum des YFP-Proteins liegt, stehen die für einen FRET notwendigen Donor- bzw. Akzeptor-Fluorophore zur Verfügung. Somit kann das Donor-Fluorophor CFP nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge seine Energie über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf das Akzeptor-Fluorophor YFP übertragen, wenn sich beide

Proteine in naher räumlicher Nachbarschaft befinden, was zur Aussendung eines fluoreszierenden Signals von YFP führt (s. 2.2.4.1).

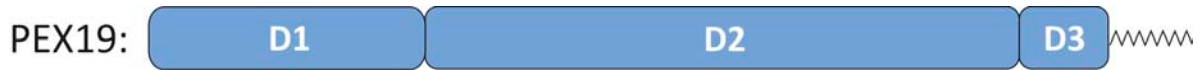


Abb. 13: Postulierte Domänenstruktur von PEX 19. D1: aa1-87, D2: aa88-272, D3: aa273-C-terminus. Die C-terminale Farnesylierung an D3 ist durch die Zickzacklinie dargestellt.

Die Aminosäuresequenz von PEX19 lässt sich durch Computer-Datenbankanalyse mit Hilfe des NCBI-BLASTP-Programms und der ProDom database in drei aufeinanderfolgende verschiedene konservierte Domänen unterteilen (Abb. 13). Die Domäne D1 (ProDom ID: PD339396) umfasst dabei die Region des N-Terminus bis zur aa87, die Domäne D2 (ProDom ID: PD 024170) die aa88-272 und Domäne D3 (ProDom ID: PD 329985) schließt die C-terminale Region bis aa273 ein (Mayerhofer *et al.*, 2002).

Für die geplanten FRET-Untersuchungen wurden diese Domänen einzeln oder in Kombination an den C-Terminus von CFP fusiniert. Die so entstandenen CFP-PEX19 Fusionsproteine (bzw. die dafür kodierenden Plasmide) wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt und sind in Tab. 9 aufgeführt.

Plasmidname	Aminosäureabschnitt von PEX19	enthaltene Domänen
CFP-PEX19-fl	aa1-273	D1, D2, D3
CFP-PEX19-D1	aa1-87	D1
CFP-PEX19-D1,D2	aa1-272	D1, D2
CFP-PEX19-D2	aa88-272	D2
CFP-PEX19-D2,D3	aa88-299	D2, D3
CFP-PEX19-D3	aa299	D3

Tab. 9: CFP-PEX19 Fusionsproteine

Um eine mögliche Interaktion zwischen PEX19 und PEX26 zu untersuchen, wurden diese Plasmide (vgl. Tab. 9) zusammen mit einem Plasmid, das für YFP-PEX26aa242-305 kodiert, mittels Magnetofektion (s. 2.2.2.4) in humane Fibroblasten co-transfiziert. Nach 24 h wurde die Expression von CFP-PEX19 und YFP-PEX26 mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abb. 14). Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Zellpellet *in vivo* mit Hilfe eines Fluoreszenz-Spektrometers vermessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 15.1-15.6 zusammengefasst.

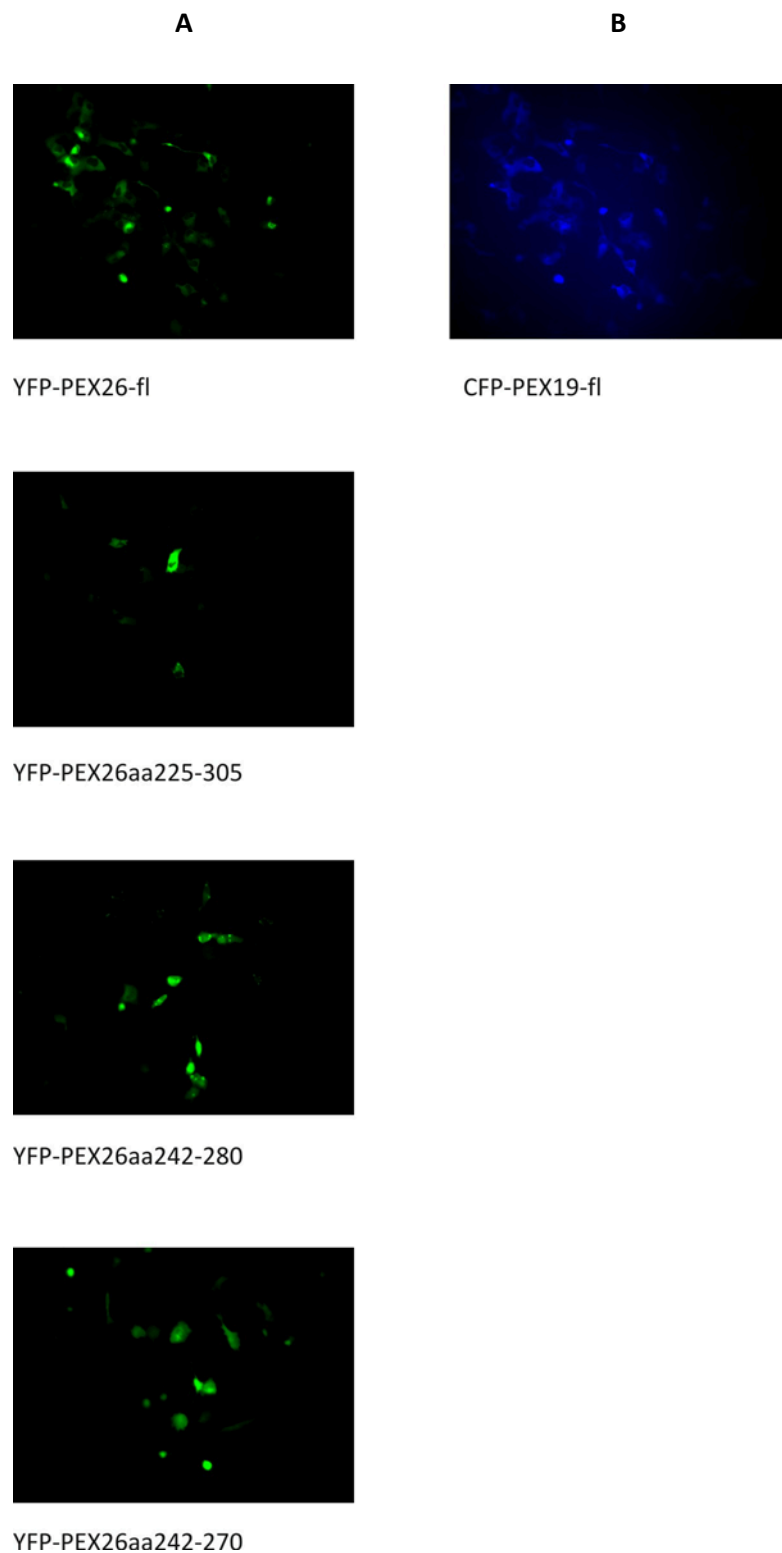


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PEX26- und PEX19-Proteinen, die mit grün (YFP) bzw. blau (CFP) fluoreszierendem Protein fusioniert wurden. Spalte A zeigt verschiedene Proteinvarianten des Peroxins YFP-PEX26, Spalte B CFP-PEX19-fl.

Die großen Diagramme der Abb. 15.1-15.6 zeigen die Emissions-Spektren der CFP-Fusionsproteine (Donor-Fluorophor). Diese wurden bei einer Wellenlänge von 433 nm angeregt, was zu einer maximalen Emission bei einer Wellenlänge von 475 nm führte. In diesem Bereich entsteht ein Maximum (1. Peak), welches die Expression der CFP-Fusionsproteine belegt. Da der Emissionsbereich des Donor-Fluorophors CFP mit einer Wellenlänge von 475 nm und der Anregungsbereich des Akzeptor-Fluorophors YFP mit einer Wellenlänge von 513 nm sehr nahe beieinander liegen, überträgt CFP seine Energie auf das fluoreszierende YFP, sobald sich beide Proteine in einem hinreichend geringen Abstand zueinander befinden. Im Fall einer Interaktion zwischen PEX19 und PEX26 wird das YFP des PEX26-Fusionsproteins durch CFP an PEX19 angeregt. Die so angeregten YFP-Fusionsproteine emittieren dann bei einer charakteristischen Wellenlänge von 527 nm, was zur Ausbildung eines weiteren Maximums (2. Peak, s. Pfeil) im Emissionsspektrum führt. Eine derartige Energieübertragung und damit stattfindende Interaktion zwischen PEX19 und PEX26 zeigen die Abb. 15.1, 15.3, 15.4 und 15.5. Bei fehlender PEX19-PEX26-Proteininteraktion bleibt die Anregung von YFP durch CFP aus, und es kommt nicht zur Entstehung eines zweiten Maximums, was in Abb. 15.2 und 15.6 deutlich wird.

Um die Expression der YFP-Fusionsproteine zu bestätigen, wurden diese in einem zweiten Emissionsspektrum bei 513 nm angeregt, was zu einem charakteristischen Emissionsmaximum bei 527 nm führt. Dies ist jeweils in den kleinen Diagrammen der Abb. 15.1-15.6 dargestellt.

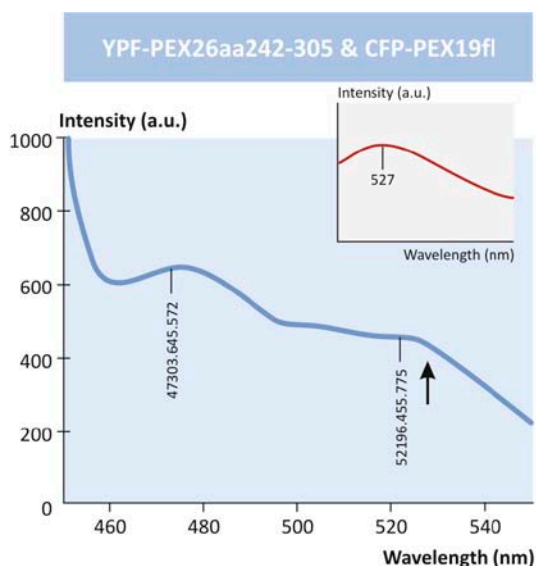


Abb. 15.1

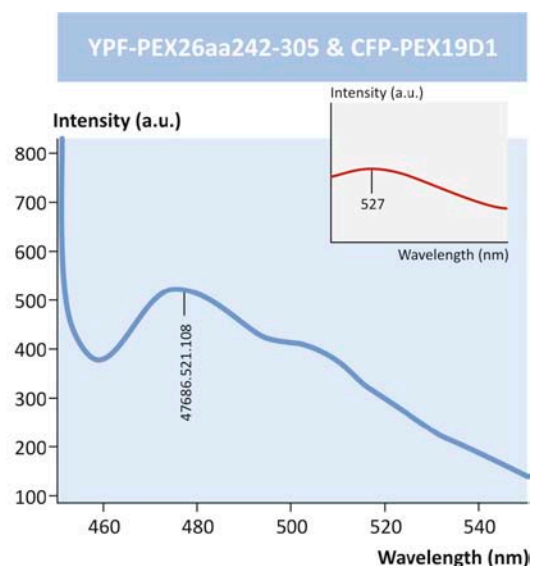


Abb. 15.2

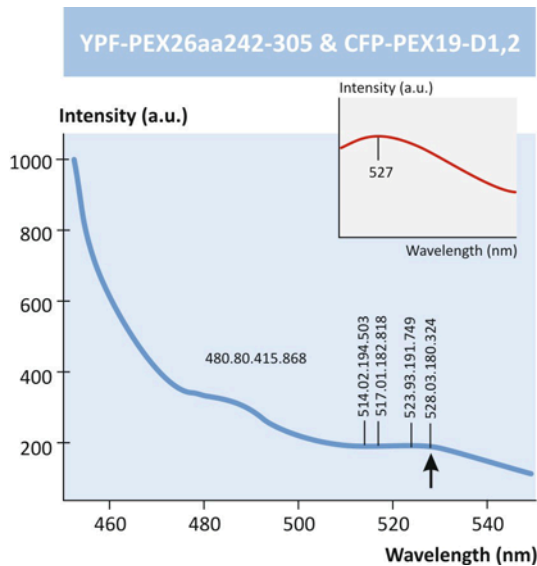


Abb. 15.3

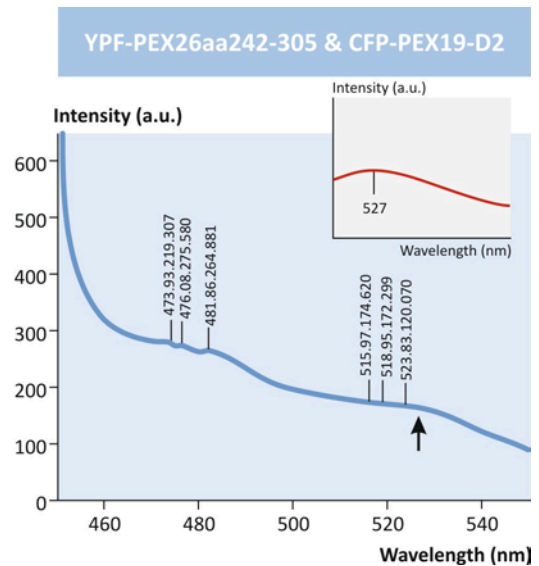


Abb. 15.4

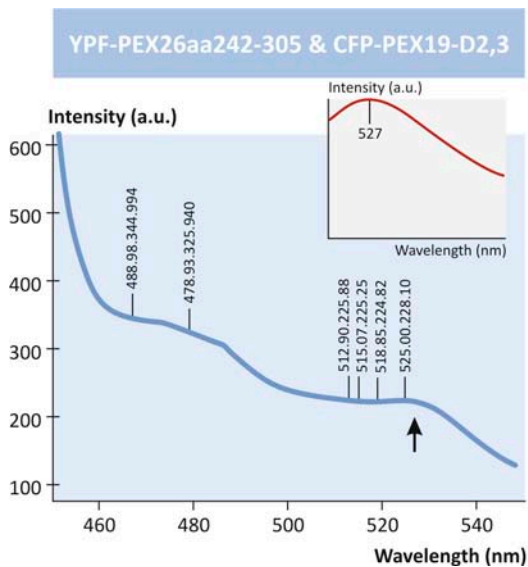


Abb. 15.5

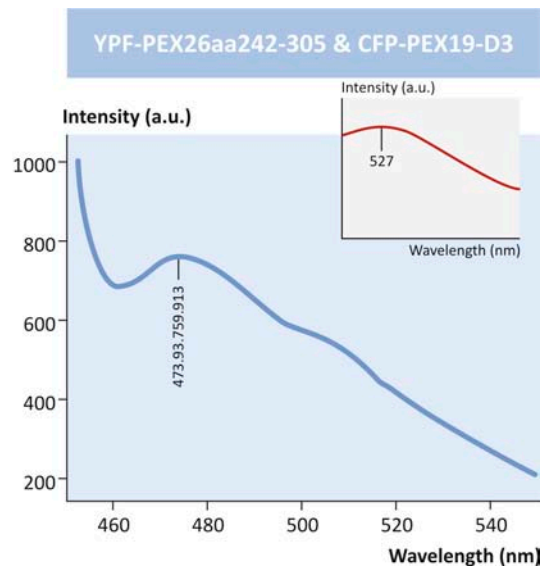


Abb. 15.6

Abb. 15.1 - 15.6: Untersuchungen zur Interaktion von YPF-PEX 26aa242-305 mit verschiedenen YPF-PEX19 Fusionsproteinen unterschiedlicher Domänenzusammensetzung. Die großen Diagramme zeigen die Emissionsspektren der CFP-Fusionsproteine. Wird CFP bei einer Wellenlänge von 433 nm angeregt, so emittiert dieses bei einer Wellenlänge von 475 nm (1. Peak). Da der Emissionsbereich von CFP nahe dem Anregungsbereich von YFP liegt, werden bei vorhandener PEX19-PEX26-Proteininteraktion die YFP-Fusionsproteine durch CFP angeregt und emittieren bei einer Wellenlänge von 527 nm (2. Peak, Pfeil). Die Expressionskontrolle der YFP-Fusionsproteine (Emissionsmaxima bei 527 nm nach Exzitation bei 513 nm) ist jeweils in den kleinen Diagrammen dargestellt.

Getestete Proteinvarianten	Ergebnis
YFP-PEX26aa242-305 + CFP-PEX19-fl	<i>Interaktion</i>
YFP-PEX26aa242-305 + CFP-PEX19-D1	<i>Keine Interaktion</i>
YFP-PEX26aa242-305 + CFP-PEX19-D1,2	<i>Interaktion</i>
YFP-PEX26aa242-305 + CFP-PEX19-D2	<i>Interaktion</i>
YFP-PEX26aa242-305 + CFP-PEX19-D2,3	<i>Interaktion</i>
YFP-PEX26aa242-305 + CFP-PEX19-D3	<i>Keine Interaktion</i>

Tab. 10: Interaktion von PEX26aa242-305 mit verschiedenen PEX19-Domänen

Tab. 10 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen zur Interaktion von PEX26aa242-305 mit unterschiedlichen Domänen des PEX19-Proteins zusammen. Es zeigte sich, dass YFP-PEX26aa242-305 mit dem Peroxin PEX 19 in seiner vollen Länge (CFP-PEX 19-fl), sowie mit der Domäne D2 bzw. den Domänenkombinationen D1+2, und D2+3 interagiert. Die einzelnen Domänen D1 und D3 zeigten keine Interaktion mit YFP-PEX 26aa242-305. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Wechselwirkungen zwischen den Peroxinen PEX26 und PEX19 allein die über die Domäne D2 von PEX19 erfolgt.

3.2.3. NÄHERE EINGRENZUNG DES PEX19-INTERAKTIONSBEREICHS VON PEX26 MITTELS FRET

Im Abschnitt 3.2.1 konnte biochemisch gezeigt werden, dass die Aminosäuren 242 bis 305 von PEX26 ausreichen, um an PEX19 zu binden. Diese Region sollte nun mittels FRET weiter eingegrenzt werden. Dazu wurde die cDNA für *CFP-PEX19fl* mit der cDNA, kodierend für das vollständige *YFP-PEX26*, sowie mit verschiedenen Abschnitten von PEX26 mittels Magnetofektion in humane Fibroblasten co-transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und das Zellpellet *in vivo* mit Hilfe eines Fluoreszenz-Spektrometers analog zu den oben beschriebenen Experimenten vermessen. Das Ergebnis ist in Tab. 11 dargestellt.

Transfizierte Plasmide	Ergebnis
CFP-PEX19-fl + YFP-PEX26-fl	<i>Interaktion</i> (Positivkontrolle)
CFP-PEX19-fl + YFP-PEX26aa225-305	<i>Interaktion</i> (Positivkontrolle)
CFP-PEX19-fl + YFP-PEX26aa242-280	<i>Interaktion</i>
CFP-PEX19-fl + YFP-PEX26aa242-270	<i>Interaktion</i> (sehr schwaches Signal)

Tab. 11: Interaktionen verschiedener PEX26-Varianten mit PEX19-fl

Die bereits bekannte Interaktion von YFP-PEX 26-fl bzw. YFP-PEX 26aa225-305 (vgl. Tab. 10) konnte mittels FRET nochmals als Positivkontrolle bestätigt werden. Des Weiteren zeigten auch YFP-PEX26aa242-280 und YFP-PEX26aa242-270 eine Wechselwirkung mit CFP-PEX19-fl.

Somit konnte gezeigt werden, dass ein PEX26-Abschnitt von 29 Aminosäuren ausreichend ist, um an PEX19 zu binden. Dieser kurze Bereich enthält das Transmembransegment von PEX26 (aa252-269) sowie die N-terminal angrenzenden 10 Aminosäuren.

3.3. SUCHE NACH INTERAKTIONSPARTNERN FÜR DAS PEROXIN PEX3

Das integrale Membranprotein PEX3 ist zusammen mit den Peroxinen PEX16 und PEX19 für die Synthese der peroxisomalen Membran verantwortlich (Haan *et al.*, 2002). PEX3 übernimmt dabei die Funktion eines „docking“-Faktors: peroxisomale Membranproteine werden von PEX19 im Zytoplasma gebunden und anschließend durch Andocken an PEX3 ins Peroxisom transportiert (Fang *et al.*, 2004; Fujiki *et al.*, 2006). Über die Struktur und Funktion von PEX3 ist bisher wenig bekannt. Als Interaktionspartner konnte bisher nur das Peroxin PEX19 biochemisch (Jones *et al.*, 2004; Sacksteder *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2000) und mittels fluorescence resonance energy transfer (FRET) identifiziert werden (Muntau *et al.*, 2003a; Muntau *et al.*, 2003b).

Um mögliche weitere PEX3 Interaktionspartner zu identifizieren, sollten PEX3-haltige Proteinkomplexe aus humanen Fibroblasten mittels Immunpräzipitation isoliert und die einzelnen potentiellen PEX3-Bindepartner mittels MALDI-MS Massenspektrometrie identifiziert werden. Analog zu den vorherigen Experimenten wurde bei diesem Versuch zur Immunpräzipitation ein GFP-PEX3-Fusionsprotein verwendet. Da dem N-Terminus von PEX3 eine fundamentale Bedeutung in der peroxisomalen Biogenese zugeschrieben wird, wurde ein Plasmid verwendet, welches nur für die Aminosäureabschnitte aa1-40 von PEX3 kodierte und mit seinem C-terminus an GFP fusioniert war (Kammerer *et al.*, 1998). Als Negativkontrolle kam zusätzlich das Plasmid pEGFP-N1 zum Einsatz, welches für GFP kodiert. Diese Plasmide wurden mittels Magnetofektion (s. 2.2.2.4) in humane Fibroblasten co-transfiziert. Um eine hohe Zellzahl zu erlangen, wurde für jeden der beiden Ansätze Fibroblasten in vier 75 cm³ Kulturflaschen gleichzeitig transfiziert. Die Expression der Proteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abb. 16).

Um potentiell bestehende Proteinwechselwirkungen zwischen dem GFP-PEX3 Fusionsprotein und gebunden Interaktionspartnern zu stabilisieren, wurde 24 h im Anschluss an die Magnetofektion der Protein-Quervernetzer (Crosslinker) DSP eingesetzt. DSP enthält an beiden Enden einen Aminreagierenden N-hydroxysuccinimide (NHS) Ester. Dieser reagiert mit Primäraminen von Proteinen und Antikörpern bei einem pH-Wert von 7,9 zu beständigen Amidverbindungen. Die so quervernetzten GFP-PEX3-Protein-Komplexe wurden anschließend per GFP-Immunpräzipitation aus dem Zellextrakt isoliert (2.2.3.1). Gewonnene Eluate mussten vor Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit DTT behandelt werden, um die Querverbindungen wieder zu lösen (s. 2.2.3.1). Die Eluate wurden im Anschluss auf Trockeneis gelagert und durch die Firma Metabion mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt.

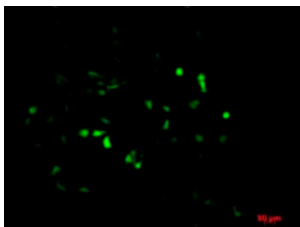


Abb. 16: Expression von PEX3aa1-40GFP in humanen Fibroblasten. Humane Fibroblasten wurden mit GFPaa1-40 cDNA transfiziert und nach 24 Std fluoreszenzmikroskopisch *in vivo* untersucht. Nach Anregung bei 488 nm gibt dabei das an die ABC-Transporter gekoppelte YFP-Protein ein grün fluoreszierendes Signal mit einem Emissionsmaximum von 509 nm ab.

In der ersten Dimension wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgte, senkrecht zur ersten Dimension, die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe (MW),

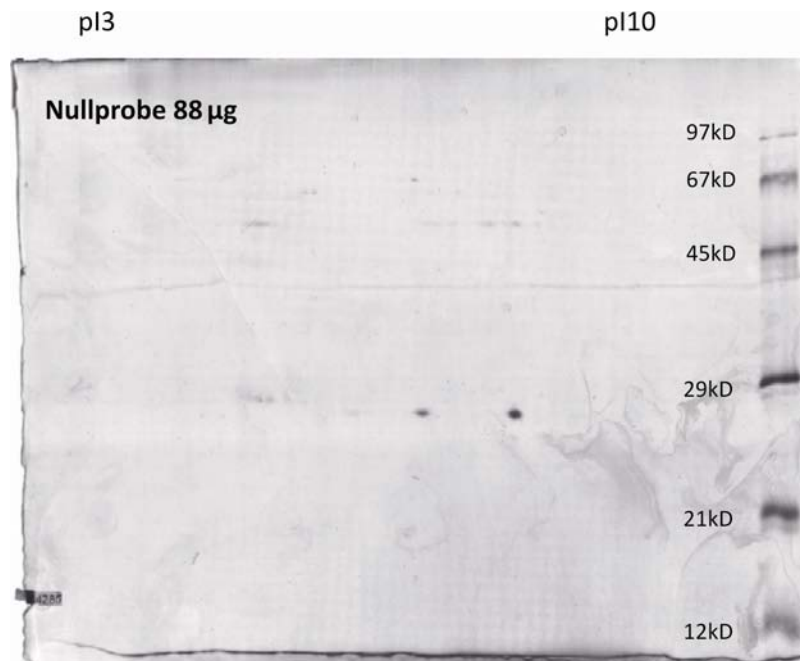


Abb.17: 2D-Gelelektrophoretische Auftrennung der an GFP gebundenen Proteine (Negativprobe). Humane Fibroblasten wurden mit pEGFP transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Proteine mit DSP quervernetzt und an die GFP-magnetic beads gebunden, gewaschen und anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. (1. Dimension pI, 2. Dimension MW)

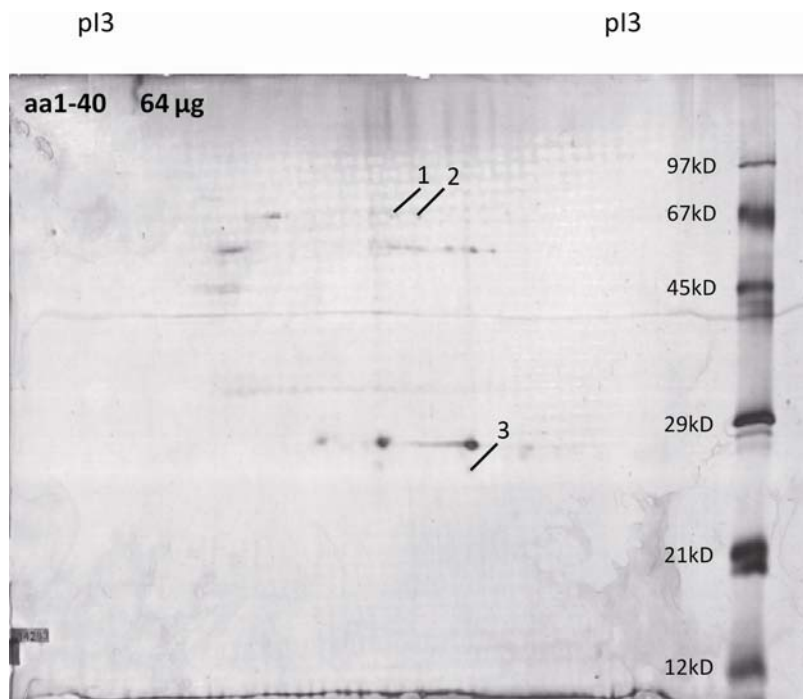


Abb. 18: 2D-Gelelektrophoretische Auftrennung der an GFP gebundenen Proteine (PEX3aa1-40) Humane Fibroblasten wurden mit PEX3aa1-40 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Proteine mit DSP quervernetzt und an die GFP-magnetic beads gebunden, gewaschen und anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. (1. Dimension pI, 2. Dimension MW)

Das so entstandene Proteinmuster der PEX3aa1-40GFP Immunpräzipitation (Abb. 17) wurde mit dem der GFP-Immunpräzipitation (Abb. 18) verglichen. Somit konnten Proteinspots, die allein durch Bindung an das GFP-Protein zustande kamen, identifiziert und von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Alle anderen Proteinspots wurden anschließend mittels MALDI-MS Massenspektrometrie (Fa. Metabion) charakterisiert. Dabei konnten für PEX3aa1-40 folgende neue potentielle Interaktionspartner identifiziert werden (Tab. 12):

	PMF – Identifizierungsergebnisse	pI	MW
1	17318569 ref NP_006112.2 keratin 1 [Homo sapiens]	8.3	66.22
2	504995 ref NP_002302.1 ligase III, DNA, ATP-dependent isoform beta [Homo sapiens]	9.5	96.9
3	20663774 pdb 1H6F B Chain B, Human Tbx3, A Transcription Factor Responsible For Ulnar- Mammary Syndrome, Bound to A Palindromic DNA Site	9.9	22.75

Tab 12: Potentielle Interaktionspartner von PEX3aa1-40

Das identifizierte Protein Keratin ist ein Sammelbegriff für verschiedene wasserunlösliche Faserproteine, die vom tierischen und menschlichen Organismus gebildet werden. Diese sind Hauptkomponente von Vogelfedern, Wolle, Schuppen, Haaren, Horn, Kopfhaut, Nägeln und des *stratum corneum* (Vignardet et al., 2001). Keratin weist eine hohe mechanische Festigkeit und Widerstandskraft gegen verschiedene proteolytische Enzyme, wie Pepsin, Trypsin und Papain auf (Thys et al., 2004), die durch die molekulare Konformation hervorgerufen wird. Die Proteinketten liegen in enger Faltung, stabilisiert durch Disulfidbrücken, in α -Helix oder β -Faltblattstruktur vor (Kreplak et al., 2004; Fraser et al., 2008). Entsprechend ihrer molekularen Konformation kommen α - und β -Keratine vor. Derzeit sind 20 Zytokeratine (CK) bekannt, die unterteilt werden in eine neutral und basische Typ-A Subfamilie und in eine saure Typ-B Subfamilie. Ein Antikörperrnachweis gegen die CK1-20 wird zur pathologischen Diagnostik eingesetzt um mögliche Mutationen im *Keratin*-Gen zu identifizieren.

Als weiterer möglicher Interaktionspartner von PEX3 wurde das Enzym LigaseIII identifiziert. Ligasen wirken bei der Verknüpfung von DNA-Strängen durch Ausbildung einer Esterbindung zwischen Phosphatrest am 5'-Ende und einer Desoxiribose am 3'-Ende. Bei Säugtieren sind Reperaturmechanismen und die Replikation der DNA von den drei Enzymen Ligase I, Ligase III und Ligase IV abhängig. Während die Ligasen I und IV ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommen, ist die Ligase III nur bei Wirbeltieren zu finden. Sie spielt eine Schlüsselrolle während der Basenexzision abhängig vom nuclearen DNA-Reperaturprotein XRCC1. Die Ligase III ist außerdem wichtig für die Integrität der mitochondrialen DNA, wo sie unabhängig von XRCC1 fungiert. Eine Inaktivierung der LigaseIII führt zu embryonaler Lethalität in einem sehr frühen Stadium (Simsek et al., 2010; Gao et al., 2011).

Die Interaktionen von Keratin1 und LigaseIII sind unspezifische Interaktionen und wurden vermutlich bei der Negativkontrolle nicht detektiert.

Als weiterer Interaktionspartner von PEX3 wurde TBX3 ermittelt. *TBX3* gehört zur Familie der T-Box-Gene. Mutationen in *TBX3* sind ursächlich für das Ulnar-Mammary-Syndrom. Es handelt sich dabei um eine extrem seltene Erbkrankheit. Die Patienten haben Anomalien des ulnaren Strahls, Hypoplasie und Dysfunktion der axillären apokrinen Drüsen und der Brustdrüsen, endokrine Funktionsstörungen (Hypogonadismus, Adipositas), Zahnanomalien und gelegentlich Fehlbildungen der inneren Organe (Davenport et al., 2003; Klopocki et al., 2006). Störungen der peroxisomalen Biogenese wurden beim Ulnar-Mammary-Syndrom bisher noch nicht beschrieben.

4. DISKUSSION

Der Transport von spezifischen Molekülen über Membranen ist lebensnotwendig für alle Organismen. Eine bedeutende Rolle bei den Transportern spielt dabei die Subfamilie der ABC- (ATP-binding-cassette) Transporter. Es handelt sich dabei um eine Reihe von integralen Membranproteinen, die den Transport von zahlreichen Substraten über biologische Membranen steuern. Die dafür benötigte Energie stammt aus der Spaltung von ATP-Molekülen, die von ABC-Proteinen gebunden werden. Bisher konnten 48 humane ABC-Gene identifiziert werden (Dean *et al.*, 2001; Higgins, 1992).

Ausschließlich in der peroxisomalen Membran kommen die Halbtransporter ABCD1, ABCD2 und ABCD3 vor. Beim Halbtransporter ABCD4 handelt es sich dagegen um ein ER-Protein (Kashiwayama *et al.*, 2009). Sie umfassen das Adrenoleukodystrophie Protein (ALDP alias ABCD1) (Mosser *et al.*, 1993), das Adrenoleukodystrophie-related Protein (ALDR-P alias ABCD2) (Lombard-Platet *et al.*, 1996), das 70-kDa peroxisomale Membranprotein (PMP70 alias ABCD3) (Gärtner & Valle, 1993; Kamijo *et al.*, 1992) und das PMP70-related Protein (PMP69 alias ABCD4) (Holzinger *et al.*, 1997b; Shani *et al.*, 1997).

Um funktionsfähige ABC-Transporter zu schaffen, ist es notwendig, dass die Halbtransporter miteinander interagieren und als Dimer einen Transporterkomplex bilden. Dies kann entweder durch Homodimerisierung oder durch Heterodimerisierung geschehen.

Untersuchungen mit Hilfe des yeast-two-hybrid assays, der Co-Immunpräzipitation und der FRET-Mikroskopie konnten zeigen, dass ABCD1 entweder homodimerisiert oder mit ABCD2 und ABCD3 Heterodimere bildet (Hillebrand *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1999; van Roermund *et al.*, 2008). Desweiteren gibt es Erkenntnisse, dass sowohl ABCD2 als auch ABCD3 in der Lage sind, in erster Linie alleine durch Homodimerisierung funktionsfähige Transporter zu formen (Guimaraes *et al.*, 2004; Hillebrand *et al.*, 2007; Kashiwayama *et al.*, 2002).

4.1. HOMO- UND HETERODIMERISIERUNG VON ABCD4

Über die Funktion des 69 kDa großen PMP69, das heute als ABCD4 bezeichnet wird, war bisher wenig bekannt. Bisher wurde ABCD4 als peroxisomales ABC Protein angesehen und somit zusammen mit ABCD1, ABCD2 und ABCD3 den peroxisomalen Membranproteinen zugeordnet (Shani *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen zeigen, dass es sich bei ABCD4 um ein ER-Protein handelt, das nicht peroxi-

somal, mitochondrial oder lysosomal lokalisiert ist. ABCD4 wird außerdem eine Rolle als *modifier*-Gen zugeschrieben (Kashiwayama *et al.*, 2009).

Durch die Tatsache, dass die drei weiteren peroxisomalen ABC-Transporter homodimerisieren, lag die Vermutung nahe, dass dies auch bei ABCD4 der Fall sein könne. Darüber hinaus könnte ABCD4 mit ABCD1 heterodimerisieren, da ABCD1 auch mit ABCD2 und ABCD3 Heterodimere bildet. Um die Homo- bzw. Heterodimerisierung von ABCD4 zu untersuchen, wurden Immunpräzipitations-Versuche durchgeführt, in denen ABCD1- bzw. ABCD4-Proteinvarianten verwendet wurden, die N-terminal mit einem YFP- bzw. HA-Protein fusioniert waren.

Somit musste zunächst sichergestellt werden, dass die YFP-Fusionsproteine aufgrund ihrer Größe nicht zu einer sterischen Behinderung der Homodimerisierung führen. Deshalb wandten wir das Immunpräzipitationsverfahren zu Validierungszwecken zunächst zur Bestätigung der in der Literatur bereits beschriebenen Interaktion ABCD1-ABCD1 an. Mit Nachweis dieser Homodimerisierung konnten sterische Probleme durch die Fusionsproteine ausgeschlossen werden, und die Methode wurde als nächstes zur Untersuchung der ABCD4-Homodimerisierung eingesetzt. Hierbei konnte erstmalig gezeigt werden, dass ABCD4 in der Lage ist, Homodimere zu bilden. Mit dem gleichen Verfahren wurde auch eine Heterodimerisierung von ABCD4 mit ABCD1 beobachtet. Daher stellte sich nun die Frage, welche dieser beiden Interaktionen von biologischer Relevanz ist.

4.1.1.1. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ABCD1-ABCD4 HETERODIMERISIERUNG UND ALD-PHÄNOTYPEN

Interessanterweise bildet ABCD4, wie auch ABCD2 und ABCD3, Heterodimere mit ABCD1.

Mutationen im *ABCD1*-Gen lösen die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (ALD, MIM 300100) aus, die häufigste peroxisomale Störung. Es handelt sich dabei um eine schwere neurodegenerative Erkrankung, die unterschiedliche phänotypische Varianten zeigt (Mosser *et al.*, 1993).

ABCD1 ist wahrscheinlich für den Transport von überlangkettigen Fettsäuren (very long chain fatty acids = VLCFAs) verantwortlich (Lazo *et al.*, 1988; Wanders *et al.*, 1988b). Bei ALD-Patienten akkumulieren diese VLCFAs im Plasma und Gewebe. Ein Zusammenhang zwischen der VLCFA-Akkumulation in Plasma und Fibroblasten von X-ALD-Patienten und der phänotypischen Expression der Krankheit konnte nicht hergestellt werden (Moser *et al.*, 2001).

Mutationen im *ABCD1*-Gen sind ungleichmäßig über das gesamte Gen verteilt. Das Mutationsspektrum umfasst dabei Missense- (50%), Frame-Shift- (26,5%), Nonsense-Mutationen (20,5%) und Deletionen (3%) (Asheuer *et al.*, 2005). Für Art und Verteilung der Mutationen im *ABCD1*-Gen besteht keine Korrelation mit der phänotypischen Ausprägung der Krankheit (Asheuer *et al.*, 2005; Moser *et al.*, 2001; Pujol *et al.*, 2002).

Asheuer *et al.* analysierten die *ABCD1*-Gen Expression in Fibroblasten, sowie in grauer und weißer Substanz des Gehirns. Der mittlere Level der Expression von *ABCD1* zeigte sich in ALD-Fibroblasten im Gegensatz zu normalen Kontrollfibroblasten erniedrigt. Zwischen dem Grad der *ABCD1*-Genexpression und phänotypischer Ausprägung der Krankheit konnte keine Korrelation festgestellt werden. Die Genexpression von *ABCD1* war bei CCER-Fibroblasten um 700%, bei AMN-C-Fibroblasten um 950% und bei AMN-Fibroblasten um 1100% reduziert. Ähnlich verhielt sich die *ABCD1*-Genexpression in der grauen und weißen Substanz des Gehirns. Bei Patienten mit CCER und AMN-C wurde eine Verminderung der Genexpression um 1200% bzw. 1400% beobachtet. In keinem dieser Gewebe konnte allerdings eine Korrelation zwischen Genexpression und Phänotyp der X-ALD festgestellt werden (Asheuer *et al.*, 2005).

Diese Beobachtung konnte auch in späteren Untersuchungen bestätigt werden. Dabei wurden bei japanischen ALD-Patienten mittels DNA-Microarray sämtliche Genmutationen (single nucleotide polymorphism, SNP) in *ABCD1* identifiziert. Auch hier konnte für Art und Verteilung der Mutationen kein Zusammenhang mit dem Phänotyp der X-ALD festgestellt werden. Ähnliches konnte in einer französischen Kontrollgruppe beobachtet werden (Matsukawa *et al.*, 2010).

Da zwischen Genmutation und Schwere der Krankheit offensichtlich keine Korrelation besteht, stellt sich nun die Frage, ob weitere genetische Faktoren und Umwelteinflüsse das Krankheitsbild beeinflussen könnten (Dubois-Dalcq *et al.*, 1999; Pujol *et al.*, 2004; Wanders *et al.*, 1988a).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Gene *ABCD2*, *ABCD3* und *ABCD4* modifizierend wirksam seien und aufgrund ihrer Sequenzhomologie mit dem *ABCD1*-Gen den Phänotyp mitbestimmen können. *ABCD2* weist 66%, *ABCD3* 38% und *ABCD4* 27% Übereinstimmung mit *ABCD1* in der Aminosäureabfolge auf (Liu *et al.*, 1999). Diese Proteine stellen aber auf jeden Fall potentielle *modifier*-Kandidaten dar, und beeinflussen möglicherweise auf diesem Weg die phänotypische Expression der X-ALD.

So führt z.B. eine Überexpression von *ABCD2* über eine Reduktion der Akkumulation von VLCFAs in Fibroblasten zur Rekonstitution des *ABCD1*-Gendefekts. Die Expression von *ABCD2* bestimmt somit den Phänotyp der Krankheit mit. Ähnliches konnte für eine Überexpression von *ABCD3* beschrieben werden (Berger *et al.*, 1999; Flavigny *et al.*, 1999; Netik *et al.*, 1999).

Um mögliche *modifier*-Gene zu identifizieren, wurde die Expression von *ABCD2*, *ABCD3* und *ABCD4* in der grauen und weißen Substanz des Gehirns sowie in Fibroblasten bei kranken und gesunden Testpersonen untersucht. Für *ABCD2* und *ABCD3* ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Genexpression und klinischem Phänotyp (Asheuer *et al.*, 2005).

Mit Hilfe von Microarrays konnten neue Mutationen im *ABCD2*-Gen bei japanischen ALD-Patienten gefunden werden. Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen der Allelträgerfrequenz und phänotypischer Ausprägung der Krankheit gefunden werden. Mit Hilfe der Nucleotid-Sequenzanalyse wurden bei der gleichen Patientengruppe neue und bekannte Mutationen im *ABCD3*- und *ABCD4*-Gen ermittelt. Auch hier gab es bei diesen Patienten keine Anzeichen, dass Genotyp und Phänotyp der Krankheit miteinander korrelieren (Matsukawa *et al.*, 2010).

Interessanterweise waren einige der bekannten *ABCD4*-Mutationen bei AMN-Patienten weniger präsent als bei Kontrollgruppen innerhalb der Bevölkerung. Für die zerebrale Form der ALD konnten allerdings keine Unterschiede ausgemacht werden. Diese Mutationen sind durch den Austausch einer hydrophilen gegen eine hydrophobe Aminosäure bzw. einer kationischen gegen eine anionische Aminosäure gekennzeichnet. In einer französischen Patientengruppe konnten oben beschriebene Beobachtungen nicht gemacht werden. Hier konnte aber die Kombination von zwei SNPs (A (rs17182959) und G (rs7158118)) vermehrt bei AMN-Patienten gefunden werden, während sie bei der zerebralen Form der ALD seltener auftrat. Es stellt sich deshalb die Frage, ob diese Mutationen in der Lage sind, die Funktion von *ABCD4* zu beeinflussen und somit Einfluß auf die phänotypische Ausprägung der ALD nehmen können (Matsukawa *et al.*, 2010).

Auch weitere Untersuchungen von *ABCD4* führten zu statistisch wenig signifikanten Werten, allerdings zeigte hier die *ABCD4*-Genexpression in der weißen Substanz eine gering ausgeprägte Korrelation mit dem ALD-Phänotyp (Asheuer *et al.*, 2005).

Damit lässt sich abschließend feststellen, dass die Proteine *ABCD2* und *ABCD3* trotz hoher Sequenzhomologie und möglicher funktioneller Redundanz zu *ABCD1* wahrscheinlich keine Bedeutung für die Ausprägung des Phänotypen bei X-ALD haben (Maier *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu könnte der Phänotyp durch den Halbtransporter *ABCD4* mitbestimmt werden, obwohl dieser die geringste Sequenzübereinstimmung aufweist.

In dieser Arbeit konnte nun erstmals eine Interaktion zwischen *ABCD4* und *ABCD1* nachgewiesen werden, welche zur Heterodimerisierung beider ABC-Halbtransporter führt. Verknüpft mit der Beobachtung, dass *ABCD4*-Genexpression in der weißen Substanz mit dem *ABCD1* Phänotyp korreliert (Asheuer *et al.*, 2005), wurde die Rolle von *ABCD4* als Modifizergen für X-ALD bekräftigt. Diese Beo-

bachtung unterstützt auch in Anbetracht der Korrelation der *ABCD4*-Genexpression in der weißen Substanz mit dem X-ALD-Phänotyp eine mögliche Rolle von *ABCD4* als *modifier*-Gen für X-ALD.

4.1.2. BEDEUTUNG VON *ABCD4* ALS MÖGLICHES *MODIFIER*-GEN

Die Erkenntnis, dass das *ABCD4*-Gen eine mögliche Modifizierfunktion hat, könnte zu gentherapeutischen Ansätzen bei der Behandlung der X-ALD führen. So besteht theoretisch die Möglichkeit, durch gezielte Aktivierung dieses Modifiziergens die Krankheit zu behandeln, ihren Verlauf zu beeinflussen oder den Ausbruch der Krankheit zu verhindern. Eventuell wäre es sogar vorstellbar, dass dieses Modifizergen dann die fehlende Funktion des defekten *ABCD1*-Gens übernimmt. Das Einschalten von „schlummernden“ intakten *modifier*-Genen könnte z.B. auf pharmakologischem Wege geschehen. So konnte im Mausmodell und in humanen Fibroblasten bereits gezeigt werden, dass ein gestörter VLCFA-Metabolismus durch verstärkte Expression von *ABCD2* korrigiert werden kann. Eine Stimulation des *ABCD2*-Gens kann in diesem Fall pharmakologisch beispielsweise durch Verabreichung von Fibraten (Berger *et al.*, 1999; Fourcade *et al.*, 2001), Schilddrüsenhormonen (Fourcade *et al.*, 2001) und 4-Phenylbutyrate (Kemp *et al.*, 1998) erreicht werden. Ein ähnlicher Effekt konnte auch durch Steigerung der *ABCD3*-Konzentration beobachtet werden.

Allerdings wurde im Mausmodell lediglich eine Korrektur des Gendefekts erreicht, was zur Abschwächung oder gar zum Verschwinden der krankheitstypischen Symptome führte. Unterschiede in der *ABCD2*- und *ABCD3*-Expression zwischen verschiedenen Kontrollgruppen traten dabei nicht auf, so dass fraglich ist, ob *ABCD2* und *ABCD3* die zerebrale Expression steuern.

Anders könnte es sich im Falle des *ABCD4*-Gens verhalten, da hier eine gewisse Modifizierfunktion nachgewiesen werden konnte (Asheuer *et al.*, 2005). Zur erfolgreichen Behandlung der X-ALD reichen die bis heute gewonnen Erkenntnisse jedoch noch nicht aus, so dass sich in Zukunft weitere Studien mit dem Zusammenhang verschiedener Modifizergene und deren Aktivierung beschäftigen müssen. So konnten Asheuer *et al.* ein weiteres Gen mit möglicher Modifizierfunktion identifizieren, das *BG1*-Gen. Dieses wird vor allem in ALD-Gewebe exprimiert und kodiert eine nicht-peroxisomale Synthetase, die Very Long-Chain Acyl-CoA Synthetase (VLCS). So konnten signifikant niedrigere Level des *BG1*-Gens bei Patienten mit childhood cerebral adrenoleukodystrophy (CCER) und Adrenomyeloneuropathie mit cerebraler Demyelinisierung (AMN-C) in der weißen Substanz beobachtet werden. Die *BG1*-Gen-Expression zeigte eine stärkere Korrelation mit dem Grad der zerebralen Demyelinisierung als mit dem klinischen Phänotyp.

Diese gentherapeutischen Ansätze bringen auch Probleme mit sich. Ein Hauptproblem ist sicherlich die Tatsache, dass die verschiedenen Gene in Hefe, Mensch und Maus unterschiedlich exprimiert werden. So ist es nur zum Teil möglich, die gewonnenen Erkenntnisse über Genexpression auf den Menschen zu übertragen.

Darüber hinaus kann die Expression der verschiedenen *ABCD*-Gene bei gleichen Arten zwischen verschiedenen Zelltypen einer Spezies stark variieren, sogar innerhalb des gleichen Organs. So ist im Gehirn der Maus die *ABCD2* mRNA Expression am stärksten im cerebralen Kortex, in der Pyramiden-schicht und in den granulären Zellschichten des Hippocampus (Troffer-Charlier *et al.*, 1998). *ABCD1* wird dagegen nicht neuronal, sondern global in den Zellen der weißen Substanz exprimiert (Troffer-Charlier *et al.*, 1998). Die Expressionsprofile der *ABCD*-Gene in Maus-Geweben und menschlichen Zelllinien sind in Tab. 13 aufgeführt. *ABCD1* und *ABCD2* sind somit obligatorische Partner, haben aber unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Zellen bzw. Geweben (Troffer-Charlier *et al.*, 1998).

	ABCD1		ABCD2		ABCD3		ABCD4	
Gewebe	Maus	Mensch	Maus	Mensch	Maus	Mensch	Maus	Mensch
Gehirn	+	+	++	++	+	+	+	+
Leber	+	++	+	+	+++	+	+	++
Niere	+	+	+	+	+++	++	+++	+++
Herz	++	++	+	++	++	+	+	+
Skelettmuskel	+	++	++	+	+	+	+	+
Milz	+	+++	+	++	+	+	+	++
Hoden	++	+++	+	+	+	+++	+	+++

	ABCD1		ABCD2		ABCD3		ABCD4	
Gewebe	Maus	Mensch	Maus	Mensch	Maus	Mensch	Maus	Mensch
Lunge	++	++	+	+	++	+	+	+++
Interstitium	++	+	–	+	++	+	+	++

Tab. 13: Expression der *ABCD* mRNAs bei Mensch und Maus (nach Berger et al., 1999 und Langmann et al., 2003)

Es stellt sich zusätzlich die Frage, mit welchem Anteil die Modifizergene wirklich das Krankheitsgeschehen beeinflussen. So beschreiben einige Autoren ABCD1 und ABCD3 als in der peroxisomalen Membran präsente Proteine, welche allerdings hauptsächlich homodimerisieren. Die nur zum geringen Teil beobachtete Heterodimerisierung hat dabei nur eine Reservoirfunktion für die Proteine (Guimaraes *et al.*, 2004; Kashiwayama *et al.*, 2002)

4.2. INTERAKTION DES PEROXINS PEX19 MIT DEM PEROXISOMALEN MEMBRANPROTEIN PEX26

Nachdem bisher 32 *PEX*-Gene in verschiedenen Organismen identifiziert werden konnten, stellt sich derzeit hauptsächlich die Frage nach der Funktion und Regulation der einzelnen Peroxine während der peroxisomalen Biogenese, Teilung und Segregation (Tabak *et al.*, 2006). Bei einem Großteil der identifizierten Peroxine handelt es sich um peroxisomale Membranproteine (PMPs) (Wanders und Waterham, 2005), welche meist am Import peroxisomaler Matrixproteine beteiligt sind (Erdmann & Blobel, 1996). Strukturanalysen und Untersuchungen von Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen führten zur Entstehung unterschiedlicher Biogenesemodelle der Peroxisomen. In jedem dieser Modelle spielt dabei das Peroxin PEX19 eine Schlüsselrolle im frühen Stadium der peroxisomalen Biogenese. Dabei geht es als peroxisomaler Membranproteinrezeptor Interaktionen mit zahlreichen peroxisomalen Membranproteinen und anderen Peroxinen ein (Jones *et al.*, 2004; Matsuzono *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 2000).

4.2.1. DIE DOMÄNE D2 VON PEX19 INTERAGIERT MIT PEX26

Das Peroxin PEX19 ist ein farnesyliertes Protein (Kammerer *et al.*, 1997), das überwiegend zytoplasmatisch, teilweise aber auch peroxisomal lokalisiert ist (Götte *et al.*, 1998; Matsuzono *et al.*, 1999; Sacksteder *et al.*, 2000). Für PEX19 konnten bereits zahlreiche Interaktionen mit verschiedenen PMPs nachgewiesen werden, da es als zytosolisch lokalisierter peroxisomaler Membranproteinrezeptor fungiert (Fransen *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2004; Rottensteiner *et al.*, 2004; Sacksteder *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2000). Unter anderem interagiert es z.B mit den peroxisomalen Halbtransportern PMP70, ALDP, ALDR und mit PMP34 (Gloeckner *et al.*, 2000).

Mittels Datenbankanalyse lässt sich das humane Peroxin PEX19 in drei konservierte Domänen unterteilen. Die amino-terminale Domäne bindet PEX3 und ist verantwortlich für das Docking an die peroxisomale Membran. Die zentrale Domäne konkurriert zusammen mit PEX5 und PEX13 um das Binden an PEX14 und könnte eine Rolle für die Aufstellung des PTS-Rezeptor Docking-Komplex spielen. Die carboxy-terminale Domäne interagiert mit verschiedenen PMPs, wie PEX3, PEX11 β , PEX12, PEX13, PEX16, PEX26 (Fransen *et al.*, 2001; Fransen *et al.*, 2005). Die Erkenntnisse über Organisation und Funktion der einzelnen PEX19-Domänen bleiben allerdings beschränkt, und es konnten ihnen keine spezifischen biologischen Funktionen zugeordnet werden (Mayerhofer *et al.*, 2002).

Um weitere Erkenntnisse über die Funktion der einzelnen Domänen von PEX19 zu erlangen, wurde in dieser Arbeit mittels IP und FRET die Interaktion zwischen PEX19 und dem peroxisomalen Membranprotein PEX26 näher charakterisiert. Hierzu wurde die Interaktion der drei PEX19-Domänen einzeln, und in verschiedenen Kombinationen, mit full-length PEX26 bzw. dem Aminosäureabschnitt aa242-305 von PEX26 untersucht.

Dabei stellte sich heraus, dass eine Wechselwirkung der beiden Peroxine unabhängig vom N-Terminus und C-Terminus des Peroxins PEX19 erfolgt. Verantwortlich für die Interaktion von PEX19 mit PEX26 war ausschließlich die konservierte Domäne D2 mit ihrem Aminosäureabschnitt aa88-272. D2 ist die am stärksten konservierte Region von PEX19 und bindet neben PEX26 auch noch die Peroxine PEX11 β , PEX12, PEX13, PEX14 und PEX16 (Fransen *et al.*, 2005). Die Domäne D2 von PEX19 scheint daher eine Schlüsselrolle in der Erkennung und Bindung von peroxisomalen Membranproteinen zu spielen. Es wurde nachgewiesen, dass D2 ein konserviertes Bindemotiv besitzt, welches das peroxisomale PMP-Targetingsignal, bestehend aus der Konsensussequenz und einer Transmembranregion, erkennt und bindet (Rottensteiner *et al.*, 2004).

Darüber hinaus konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Bindestudien belegt werden, dass die Domäne D3 von PEX19, die ein farnesylierbares C-terminales CaaX-Prenylierungsmotiv (CLIM) besitzt (Kammerer *et al.*, 1997), nicht für die Bindung an PEX26 benötigt wird. Eine Prenylierung von Proteinen erhöht deren Hydrophobizität und vermittelt nicht nur Kontakte mit Zielmembranen, sondern ist auch für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung (Marshall, 1993). Darüber hinaus ist sie für die Reifung vieler Proteine von Bedeutung, die Schlüsselfunktionen in der Signaltransduktion und der Regulation des Zellwachstums spielen. So ist z.B. die Interaktion verschiedener prenylierter Proteine mit spezifischen Chaperonsystemen für den Transport zur Zellmembran verantwortlich (Casey, 1992). Ähnliches gilt für die Interaktion des prenylierten Proteins Ki-Ras mit den Mikrotubuli (Thissen *et al.*, 1997).

Da PEX19 unabhängig von dessen Farnesylierungsmotiv an PEX26 bindet, kann vermutet werden, dass die Farnesylierung möglicherweise nur eine Verstärkung der Interaktion von PEX19 und PEX26 hervorruft. Die Verstärkung der Interaktion zwischen PEX19 und anderen PMPs durch die Farnesylierung konnte bereits nachgewiesen werden (Gloeckner *et al.*, 2000). Demnach könnte die Erhöhung der Hydrophobizität durch die Farnesylierung die Wechselwirkung mit hydrophoben Domänen erleichtern und hilft somit, neusynthetisierte Proteine in ihre funktionelle Konformation zu bringen. Die Farnesylierung könnte auch an einer Chaperon-Funktion von PEX19 (Fang *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2004) beteiligt sein.

Abschließend kann man sagen, dass die Interaktion zwischen PEX19 und PEX26 allein durch die Domäne D2 zustande kommt, d.h. vom gleichen Abschnitt von PEX19 abhängt wie dessen Interaktion mit anderen PMPs (Fransen *et al.*, 2005). Somit muss das Targeting von PEX26 zur peroxisomalen Membran in Abhängigkeit von PEX19 stattfinden. All diese Beobachtungen stützen das gegenwärtige Modell zur Funktion von PEX19-Funktion: Dabei fungiert PEX19 als löslicher zytosolischer Importrezeptor für die meisten PMPs (Fang *et al.*, 2004; Halbach *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004). PEX19 erkennt sein Substrat im Zytosol, bindet es dort über seine Domäne D2 und leitet es im Anschluss daran zur peroxisomalen Membran, wo es dann an seinen Docking-Faktor PEX3 bindet (Fang *et al.*, 2004; Götte *et al.*, 1998; Muntau *et al.*, 2003b). Dort wird wahrscheinlich mit Hilfe von PEX19 die Insertion der PMPs in die peroxisomale Membran erleichtert.

Bereits die überwiegend zytosolische Lokalisation von PEX19 lässt die Funktion eines löslichen Proteinimportrezeptors vermuten. Ein weiterer Grund, der für eine Rezeptorfunktion von PEX19 spricht, ist die Tatsache, dass ein Verlust von PEX19 zum Verlust peroxisomaler Strukturen, zur Destabilisierung vieler integraler PMPs und zur Fehlleitung anderer PMPs zu den Mitochondrien führt (Sacksteder *et al.*, 2000). Auch Halbach *et al.*, 2006, geben Hinweise auf eine Rezeptorfunktion von PEX19. Eine Hemmung von PEX19 durch siRNA führt zu einem starken Konzentrationsanstieg von neu syn-

thetisiertem PEX26 im Zytosol, welches dann zu den Mitochondrien fehlgeleitet wird. Allerdings machte die gleiche Arbeitsgruppe auch Beobachtungen, die darauf schließen lassen, dass PEX19 nicht allein für das Targeting von PEX26 verantwortlich ist. So zeigten PEX19-Zellen, die wie oben beschrieben behandelt wurden, eine doppelte Verteilung von PEX26 – zu den Peroxisomen und zu den Mitochondrien. Diese Tatsache spricht gegen eine alleinige Rezeptor-Theorie von PEX19 und lässt vermuten, dass PEX19 mit einem oder mehreren anderen Rezeptoren und Chaperonen im Zytosol konkurriert.

4.2.2. ZWEI PEX19-BINDEMOTIVE IN PEX26

Das Peroxin PEX26 ist ein 305 Aminosäuren (aa) umfassendes integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa. Es besitzt eine C-terminale transmembrane Domäne und einen zytosolischen N-Terminus, der mit PEX1/PEX6 Heterodimeren direkte und indirekte Bindungen eingeht (Furuki *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2003a).

Um weitere Erkenntnisse zur Erkennung und Bindung von PEX19 an seine PMP-Substrate zu erarbeiten, wurden Interaktionen zwischen PEX19 und verschiedenen Aminosäureabschnitten von PEX26 untersucht. Dadurch sollten Proteinmotive in PEX26 identifiziert und charakterisiert werden, welche von PEX19 erkannt werden. Bisher ist bekannt, dass die große zytosolische Domäne von PEX26, welche die aa2-244 umfaßt, keine Interaktion mit PEX19 eingeht. Im Gegensatz dazu interagiert die C-terminale Domäne, bestehend aus den aa245-305, mit PEX19 (Halbach *et al.*, 2006). Diese Domäne beinhaltet zwei potentielle, durch Computer-Datenbankanalyse identifizierte Bindestellen für das Peroxin PEX19: die erste umfasst die aa253-267 (Matsumoto *et al.*, 2003a), die zweite die aa276-290 (Halbach *et al.*, 2005). In dieser Arbeit zeigten alle Abschnitte von PEX26, welche die entsprechenden PEX19-Bindemotive enthielten, deutliche Signale im FRET. Auf diese Weise konnten wir Interaktionen von YFP-PEX26-fl, YFP-PEX26aa225-305, YFP-PEX26aa242-280 und YFP-PEX26aa242-270 mit CFP-PEX19fl nachweisen. Diese Ergebnisse belegen eine Interaktion von beiden PEX19-Bindemotiven von PEX26 mit PEX19.

Auch Halbach *et al.*, 2006 zeigten die Interaktion von PEX26 und PEX19 sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*. Mittels eines two-hybrid-assays stellten sie fest, dass aa275-305 von PEX26 zu einer schwachen PEX26-PEX19-Interaktion führt. Dieses Ergebnis zeigt das Vorhandensein der zweiten Bindestelle aa276-290. Diese zuvor von Halbach *et al.*, 2005 vorhergesagte zweite PEX19-Bindestelle in PEX26 wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Zu einem konträren Ergebnis kommen Halbach *et al.*, 2006 allerdings bei der ersten Bindestelle (aa253-267). Hier konnte für

PEX26aa245-274 keine Interaktion mit PEX19 nachgewiesen werden. In dieser Arbeit zeigen dagegen die vergleichbaren Abschnitte aa242-280 und aa242-270 von PEX26 eine deutliche bzw. eine schwächere Interaktion mit PEX19. Somit kann vermutet werden, dass die von Halbach *et al.*, 2006 verwendete Methode im Gegensatz zu FRET weniger sensitiv ist, und somit eine Detektion dieser Bindestelle nicht zuließ.

Darüber hinaus untersuchten Halbach *et al.*, 2006 die Interaktionen *in vivo* mit Hilfe eines GST-Proteins, das an PEX19 fusioniert wurde. Durch diese Methode konnten unter Zuhilfenahme monoklonaler anti-GST-AK und sekundärer HRP-AK beide Bindestellen in PEX26 identifiziert werden. Verwendet wurden dazu die beiden Aminosäureabschnitte PEX26aa248-270 und PEX26aa276-296. Die Affinität von PEX26aa248-270 zu PEX19, welches das erste identifizierte Bindemotiv aa253-267 enthält, war dabei 3-4mal stärker als die von PEX26aa276-296, welches das zweite Bindemotiv beinhaltet.

Ein ähnliches Ergebnis konnte auch in dieser Arbeit erzielt werden. Die stärkere Interaktion von aa242-280 gegenüber aa242-270 könnte somit zustande kommen, weil sich hier Abschnitte des ersten und zweiten Bindemotivs überlagern. Ähnliches gilt auch für aa225-305. Da hier beide Bindestellen vorhanden sind, lässt sich die starke Interaktion erklären.

In dieser Arbeit zeigte auch der Aminosäureabschnitt aa242-270 mit dem zweiten Bindemotiv eine Wechselwirkung mit PEX19, allerdings mit einem im Vergleich zu den restlichen Sequenzen nur sehr schwach ausgeprägten Signal. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der alleinige Aminosäureabschnitt aa242-270 für die Bindung und damit für ein gut detektierbares FRET-Signal eine zu geringe Größe aufweist. Außerdem ist der von uns untersuchte Abschnitt aa242-270 um drei Aminosäuren in Richtung N-Terminus in Bezug auf den von Halbach untersuchten Abschnitt aa245-275 verschoben, was zu einer veränderten Aminosäuren-Sekundärstruktur und somit zu einer veränderten Bindeaffinität zu PEX19 führen könnte. Ein deutlich stärkeres FRET Signal konnte hingegen erzielt werden, wenn das 10 Aminosäuren längere YFP-PEX26aa242-280 für die Bindestudien verwendet wurde.

Das Targeting von PEX26 ist somit von den PEX19-Bindemotiven abhängig und PEX26 folgt der PEX19-abhängigen Targeting-Route, die auch von den meisten PMPs genutzt wird. Das Fehlen der entsprechenden Bindemotive (z.B. PEX26aa2-244) und Mutationen im *PEX19*-Gen führen zur Fehlleitung von PEX26 in die Mitochondrien (Halbach *et al.*, 2006). Ähnliches kann man auch für PEX12, PEX14 und ALDP beobachten (Sacksteder *et al.*, 2000).

Mutationen im humanen *PEX26*-Gen selbst führen zu Erkrankungen der peroxisomalen Biogenese (peroxisomal biogenesis disorders, PBD). Die humanen PBD werden in 12 Komplementationsgruppen (complementation groups, CGs) unterteilt. Bei Patienten der relativ häufigen CG8 konnten *PEX26*-

Mutationen als molekulare Ursache der Erkrankung identifiziert werden (Furuki *et al.*, 2006; Matsu-moto *et al.*, 2003b; Steinberg *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2005). Der klinische Phänotyp korreliert dabei mit dem Schweregrad des Defekts im Proteinmatriximport und reicht vom schweren Zellweger-Syndrom (ZS) bis zur etwas milder verlaufenden neonatalen Adrenoleukodystrophie (NALD) und zur infantilen Refsum-Krankheit (IRD). Auf molekularer Ebene lassen sich bei *PEX26*-Mutationen ein gestörter bis vollständig defekter Katalase- und Thiolaseimport beobachten. Zusätzlich treten je nach Schweregrad der *PEX26*-Mutation Veränderungen im Import von PTS1- und PTS2- Proteinen auf (Furuki *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2005).

Mutationen im *PEX26*-Gen und die daraus resultierenden Veränderungen in der Proteinsequenz führen zu den oben beschriebenen Krankheitsbildern. Allerdings zeigt die bisher beschriebene Charakterisierung der Missense-Mutationen im *PEX26*-Gen, dass *PEX26* weiterhin mit *PEX19* interagiert und diese somit weiter zum Peroxisom lokalisieren (Furuki *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2005). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass diese Mutationen alle außerhalb der Region für *PEX19*-Bindemotive lokalisiert sind. Es existieren aber zusätzlich Nonsense-Mutationen, Deletionen und Insertionen, die zu verkürzten *PEX26*-Fragmenten führen. Die Interaktion mit *PEX19* findet über den C-terminus von *PEX26* statt. Da in dieser Region auch die Bindemotive für *PEX19* liegen, könnten Mutationen in dieser Region von *PEX26* die Interaktion zwischen *PEX26* und *PEX19* stören.

4.3. TBX3, EIN NEUER POTENTIELLER INTERAKTIONSPARTNER VON PEX3

Über die Interaktionspartner von *PEX3* ist bisher wenig bekannt. Bisher konnte ausschließlich, wie oben beschrieben, eine Interaktion mit *PEX19* bewiesen werden. Dabei fungiert es als Docking-Faktor für *PEX19* sowohl an der peroxisomalen Membran (Fang *et al.*, 2004), als auch an der ER Membran im frühen Stadium der peroxisomalen Biogenese (Baerends *et al.*, 1996; Hoepfner *et al.*, 2005). Daher ist es wahrscheinlich, dass *PEX3* noch mit weiteren Proteinen, wie z.B. weiteren Peroxinen, ER-Membranproteinen, oder zytosopischen Chaperonen, Interaktionen eingeht. Auf Grund der essen-tiellen Rolle von *PEX3* bei der frühen peroxisomalen Biogenese sollten im Rahmen der hier vorliegen-den Arbeit weitere Interaktionspartner von *PEX3* identifiziert werden. Dazu wurde ein Plasmid, wel-ches für ein *PEX3*-GFP Fusionsprotein kodiert, in humane Fibroblasten transfiziert. Durch diese *in vivo* Expression von *PEX3* sollten möglichst viele Interaktionspartner in den verschiedensten Zellkompar-timenten erreicht werden. Für diese Versuche wurde ein *PEX3*-Fragment (aa1-40) verwendet, wel-ches allein für das Targeting des Gesamtproteins zum Peroxisom verantwortlich ist (Kammerer *et al.*, 1998). Da, anders als bei allen weiteren PMPs, das Targeting von *PEX3* unabhängig von *PEX19* ist,

sind wir bei unseren Untersuchungen davon ausgegangen, dass andere Proteine an diesen kurzen PEX3-Abschnitt binden können.

Potentielle Bindepartner, die nur schwach mit PEX3 interagieren, wurden durch den eingesetzten Quervernetzer DSP kovalent an PEX3-GFP gebunden. Die so entstandenen Proteinkomplexe wurden daraufhin durch GFP-Immunpräzipitation isoliert, mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die einzelnen Proteine mittels Massenspektroskopie identifiziert.

Dabei gelang es, TBX3 als weiteren Interaktionspartner von PEX3 zu identifizieren. Dabei muss die Bindung an TBX3 über den N-Terminus von PEX3 erfolgt sein, da nur der kurze Abschnitt von aa1-40 von PEX3 (fusioniert mit GFP) für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde. Die Immunpräzipitation mit GFP alleine als Kontrollexperiment führte zu keiner Bindung von TBX3. Weitere zukünftige Versuche wie GST-pull down Bindeversuche müssen nun diese neu gefundene Proteininteraktion zwischen TBX3 und PEX3 verifizieren und näher charakterisieren.

TBX3 gehört zur Familie der T-Box-Gene. Mutationen in *TBX3* sind ursächlich für das Ulnar-Mammary-Syndrom. Es handelt sich dabei um eine extrem seltene Erbkrankheit. Die Patienten zeigen Anomalien des ulnaren Strahls, Hypoplasie und Dysfunktion der axillären apokrinen Drüsen und der Brustdrüsen, endokrine Funktionsstörungen (Hypogonadismus, Adipositas), Zahnanomalien und manchmal Fehlbildungen der inneren Organe (Davenport *et al.*, 2003; Klopocki *et al.*, 2006). Störungen der peroxisomalen Biogenese wurden beim Ulnar-Mammary-Syndrom bisher noch nicht beschrieben.

4.3.1. STEUERUNG DER PEROXISOMALEN BIOGENESE DURCH PEX3 UND SEINE INTERAKTIONSPARTNER

Der Ablauf der peroxisomalen Biogenese wird durch verschiedene *PEX*-Gene gesteuert (Distel *et al.*, 1996). Das Peroxin PEX3 greift dabei zu einem frühen Zeitpunkt entscheidend in die peroxisomale Biogenese ein (Baerends *et al.*, 1996; Hettema *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 1999, 1999). Humanes PEX3 ist mit seinem C-Terminus fest in der peroxisomalen Membran verankert, während der N-Terminus in das Zytosol hinein reicht (Kammerer *et al.*, 1998; Soukupova *et al.*, 1999). PEX3 wird somit für das Anreichern weiterer peroxisomaler Proteine in der Membran benötigt und spielt eine Rolle als Docking-Faktor für das zytosolisch lokalisierte PEX19 (Fang *et al.*, 2004).

Die Interaktion von PEX3 und PEX19 ist Voraussetzung für die Biogenese der peroxisomalen Membran. Im Gegensatz zu Hefezellen ist in Säugetierzellen noch zusätzlich eine Interaktion mit PEX16 notwendig (Eitzen *et al.*, 1997; Honsho *et al.*, 1998; South & Gould, 1999). In diesem Zusammenhang zeigten Thoms *et al.* detailliert die Aufgabe des Sec61-Komplexes, ein proteinleitender Kanal des ER, für die peroxisomale Entwicklung. So führt eine verminderte Aktivität von Sec61 zu einer Abnahme des Transports von PEX3 in das ER und bei Inaktivierung wird die peroxisomale Neogenese blockiert. Der Sec61-Kanal ist die Haupteintrittspforte für Proteine in das endomembrane System und steuert den selektiven Transport von löslichen und integralen Membranlipiden in und über die Membran. Beim Säugetier-Sec61-Kanal handelt es sich um einen Membranproteinkomplex, der aus einer großen α -Untereinheit und zwei kleineren β - und γ -Untereinheiten besteht. In Hefen konnte neben dem Sec61- auch der Ssh1-Komplex identifiziert werden. Beide sind für die Integration von Proteinen in das ER verantwortlich (Thoms *et al.*, 2011).

Außerdem wurden mittels *in silico* Analyse durch Thoms *et al.* Targetingsignale in PEX3 berechnet. Dabei konnte in fast allen getesteten PEX3-Sequenzen unterschiedlicher Spezies eine N-terminale Bindestelle, bestehend aus einer n-Region von 5-6 Aminosäuren und einer h-Region von 15-22 Aminosäuren, identifiziert werden. Mutationen in diesen Regionen verhindern einen Import von PEX3 in das Peroxisom. Damit benötigt das Targeting von PEX3 neben dem Sec61-Komplex ein N-terminales Targetingsignal (mPTS, membran PTS), das analog zu den Marixproteinsignalsequenzen PTS1 und PTS2 existiert. PEX3 könnte somit ein Sec61-Substrat sein (Thoms *et al.*, 2011).

Zellen mit mutiertem *PEX3*-Gen weisen keine detektierbaren Peroxisomen auf und sind durch rapiden Verlust der meisten PMPs und der Fehlleitung anderer PMPs zu den Mitochondrien oder anderen zellulären Membranstrukturen gekennzeichnet (Hettema *et al.*, 2000; South & Gould, 1999). Schließlich konnte bewiesen werden, dass PEX3 für den Import von „class I“-PMPs eine wesentliche Rolle spielt (Fang *et al.*, 2004). *TBX3* ist an diesem Prozess wahrscheinlich nicht beteiligt, da bis jetzt noch keine Mutationen in *TBX3* beschrieben wurden, welche zu Störungen in der peroxisomalen Biogenese führen. Patienten mit einer gestörten peroxisomalen Biogenese zeigen eine Vielfalt von verschiedenen klinischen Phänotypen, wobei viele Verlaufsformen bereits in der frühen Kindheit einen letalen Ausgang nehmen (Gould *et al.*, 1995), wie z.B. beim Zellweger-Syndrom, verursacht durch eine *PEX3*-Genmutation (Muntau *et al.*, 2000b).

Bisher wurden die peroxisomalen Proteine PEX3 und PEX19 hauptsächlich mit der peroxisomalen Biogenese in Verbindung gebracht. Die hier beschriebene Interaktion zwischen PEX3 und *TBX3* könnte ein Hinweis darauf sein, dass Peroxine noch weitere zelluläre Aufgaben erfüllen oder aber auch eine weitaus komplexere Regulation der peroxisomalen Biogenese bewirken (vgl. 4.3.3).

4.3.2. STEUERUNG DER TUMORSUPPRESSION DURCH TBX3 UND SEINER INTERAKTION MIT PEROXISOMALEN PROTEINEN

Das T-Box-Gen *TBX3* ist ein potenter Inhibitor und verhindert die Expression von p19ARF bei der Maus und von p14ARF beim Menschen (Brummelkamp *et al.*, 2002). Bei p19ARF wiederum handelt es sich um ein Tumorsuppressor-Protein, das eine wichtige Rolle bei der Seneszenz (Zellproliferationsarrest) spielt.

Bei Nagern interagieren p19ARF und Mdm2 im Zellkern (Kamijo *et al.*, 1998; Tao & Levine, 1999), was die Aktivierung des Proteins p53 zur Folge hat. Dieser p19ARF-Mdm2-p53-pathway schützt die Zellen vor onkogener Transformation und vermittelt eine antiproliferative Antwort bei der Tumorgenese (Parkinson *et al.*, 2000; Sharpless *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001).

Bekannt ist, dass p19ARF und PEX19 im Zytoplasma miteinander interagieren. Eine Überexpression von PEX19 führt zur Ausschleusung von p19ARF aus dem Nucleus in das Zytoplasma. Damit wird die Interaktion mit Mdm2 unterbrochen, was über die Hemmung der Ubiquitinligase die Inaktivierung der p53-Funktion verursacht (Honda & Yasuda, 1999; Sugihara *et al.*, 2001).

Die Vermutung, dass das peroxisomale Protein PEX19 den p19ARF-Mdm2-p53-pathway hemmt und eine Rolle bei der Tumorsuppression spielt, konnte aber nur bei der Maus bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte beim Menschen keine Beeinflussung von p14ARF durch PEX19 festgestellt werden. Weder der Hefe-two-hybrid-assay, noch der mammalian-two-hybrid-assay liefern Anhaltspunkte für eine PEX19-p14ARF-Interaktion. Das ARF-Protein wird bei Maus und Mensch unterschiedlich kontrolliert. Humanes ARF ist um 40 Aminosäuren kürzer als das Maus-ARF und kann aufgrund der fehlenden PEX19-Bindungsstelle nicht mit PEX19 interagieren, und somit auch nicht in seiner Funktion eingeschränkt werden. Dieser Unterschied liefert eventuell eine Erklärung für die höhere Belastbarkeit und den größeren Widerstand der humanen Zellen zur Immortalisation (Bates *et al.*, 1998; Wadhwa *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion zwischen PEX3 und TBX3 führt nun zu einer neuen Hypothese. So wäre es theoretisch möglich, dass das peroxisomale Protein PEX3 über eine Interaktion mit TBX3 die Expression von p14ARF beim Menschen beeinflusst. PEX3 könnte eine ähnliche Rolle wie PEX19 bei der Maus spielen, und auf diese Weise den Ablauf der Zellproliferation steuern bzw. die Tumorsuppression hemmen.

4.3.3. AUSBLICK: DIE ROLLE VON PEROXINEN IN ANDEREN NICHT-PEROXISOMALEN ZELLULÄREN PROZESSEN

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Peroxine PEX3 und PEX19 primär für die peroxisomale Biogenese von Bedeutung sind (Hoepfner *et al.*, 2005). Vor allem PEX19 wurde als wichtiges Peroxin für die Biogenese der Peroxisomen betrachtet. Aufgrund seiner überwiegend zytosolischen Lokalisation, wurde davon ausgegangen, dass PEX19 hauptsächlich ein Docking-Protein und peroxisomaler Rezeptor ist.

Die hier gezeigte PEX3-TBX3 Interaktion gibt mögliche Anhaltspunkte für weitere Zellfunktionen der peroxisomalen Proteine. So besteht offensichtlich eine Verknüpfung der Peroxine mit der Apoptose und der Tumorsuppression (Bates *et al.*, 1998; Wadhwa *et al.*, 2002).

Auch gibt es Hinweise, dass PEX19 Einfluss auf die renale Reabsorption im proximalen Tubulus hat, was für die Beständigkeit der Plasma-Pi-Homöostase essentiell ist. In der apikalen Membran von renalen Tubuluszellen ist ein Na/PiIIa-co-Transporter lokalisiert, der die renale Reabsorption von Pi steuert. In diesem co-Transporter befindet sich ein „endocytic motif“ (KR), das eine starke Bindung mit dem peroxisomalen Protein PEX19 eingeht. Die Expression von PEX19 stimuliert somit über eine Interaktion mit KR die Endozytose von NaPi-KR-Protein. Für das Zustandekommen dieser Interaktion ist die Farnesylierung von PEX19 Voraussetzung (Ito *et al.*, 2004). Damit hat die Farnesylierung von PEX19 zur Erhöhung der Hydrophobizität, um so eine Verstärkung der Interaktionen mit weiteren PMPs zu erreichen, nur sekundäre Bedeutung.

Die Peroxine sind also neben ihren Aufgaben im Rahmen der peroxisomalen Biogenese an verschiedensten Zellfunktionen beteiligt. Ziel zukünftiger Arbeiten wird es daher sein, weitere und genauere Erkenntnisse über Mechanismen und Zellfunktionen der peroxisomalen Proteine zu erlangen.

Agne, B., Meindl, N. M., Niederhoff, K., Einwachter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., Girzalsky, W. & Kunau, W. H. (2003). Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell* **11**, 635-646.

Agrawal, G., Joshi, S. & Subramani, S. (2011). Cell-free sorting of peroxisomal membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9113-9118.

Asheuer, M., Bieche, I., Laurendeau, I., Moser, A., Hainque, B., Vidaud, M. & Aubourg, P. (2005). Decreased expression of ABCD4 and BG1 genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* **14**, 1293-1303.

Baerends, R. J., Rasmussen, S. W., Hilbrands, R. E. & other authors (1996). The Hansenula polymorpha PER9 gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity. *J Biol Chem* **271**, 8887-8894.

Baes, M., Gressens, P., Baumgart, E. & other authors (1997). A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat Genet* **17**, 49-57.

Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L. & Vousden, K. H. (1998).

p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**, 124-125.

Berger, J., Albet, S., Bentejac, M., Netik, A., Holzinger, A., Roscher, A. A., Bugaut, M. & Forss-Petter, S. (1999). The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression. *Eur J Biochem* **265**, 719-727.

Blattner, J., Swinkels, B., Dorsam, H., Prospero, T., Subramani, S. & Clayton, C. (1992). Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. *J Cell Biol* **119**, 1129-1136.

Bowen, P., Lee, C. S., Zellweger, H. & Lindenberg, R. (1964). A Familial Syndrome of Multiple Congenital Defects. *Bull Johns Hopkins Hosp* **114**, 402-414.

Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S. J. & Valle, D. (1997). Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nat Genet* **15**, 369-376.

Braverman, N., Dodt, G., Gould, S. J. & Valle, D. (1998). An isoform of pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. *Hum Mol Genet* **7**, 1195-1205.

Breidenbach, R. W. & Beevers, H. (1967). Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 462-469.

Brocard, C., Kragler, F., Simon, M. M., Schuster, T. & Hartig, A. (1994). The tetratricopeptide repeat-domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal-SKL. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 1016-1022.

Brosius, U., Dehmel, T. & Gartner, J. (2002). Two different targeting signals direct human peroxisomal membrane protein 22 to peroxisomes. *J Biol Chem* **277**, 774-784.

Brown, L. A. & Baker, A. (2003). Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med* **7**, 388-400.

Brummelkamp, T. R., Kortlever, R. M., Lingbeek, M., Trettel, F., MacDonald, M. E., van Lohuizen, M. & Bernards, R. (2002). TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *J Biol Chem* **277**, 6567-6572.

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203. **Casey, P. J. (1992).** Biochemistry of protein prenylation. *J Lipid Res* **33**, 1731-1740.

Chang, C. C., Warren, D. S., Sacksteder, K. A. & Gould, S. J. (1999). PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J Cell Biol* **147**, 761-774.

- Childs, S. & Ling, V. (1994).** The MDR superfamily of genes and its biological implications. *Important Adv Oncol*, 21-36.
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. (1993).** Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212-1218.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. & del Rio, L. A. (2001).** Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**, 145-150.
- Crookes, W. J. & Olsen, L. J. (1998).** The effects of chaperones and the influence of protein assembly on peroxisomal protein import. *J Biol Chem* **273**, 17236-17242.
- Crookes, W. J. & Olsen, L. J. (1999).** Peroxin puzzles and folded freight: peroxisomal protein import in review. *Naturwissenschaften* **86**, 51-61.
- Dammai, V. & Subramani, S. (2001).** The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* **105**, 187-196.
- Davenport, T. G., Jerome-Majewska, L. A. & Papaioannou, V. E. (2003).** Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome. *Development* **130**, 2263-2273.
- Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. (2001).** The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**, 1007-1017.
- Dean, M. (2005).** The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol* **400**, 409-429.
- DeDuve, C. & Baudhuin, P. (1966).** Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev*, 46, 323-357.
- Diestelkotter, P. & Just, W. W. (1993).** In vitro insertion of the 22-kD peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J Cell Biol* **123**, 1717-1725.
- Distel, B., Erdmann, R., Gould, S. J. & other authors (1996).** A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J Cell Biol* **135**, 1-3.
- Dodt, G., Braverman, N., Wong, C., Moser, A., Moser, H. W., Watkins, P., Valle, D. & Gould, S. J. (1995).** Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* **9**, 115-125.
- Dubois-Dalcq, M., Feigenbaum, V. & Aubourg, P. (1999).** The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends Neurosci* **22**, 4-12.
- Eckert, J. H. & Erdmann, R. (2003).** Peroxisome biogenesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **147**, 75-121.
- Eitzen, G. A., Szilard, R. K. & Rachubinski, R. A. (1997).** Enlarged peroxisomes are present in oleic acid-grown *Yarrowia lipolytica* overexpressing the PEX16 gene encoding an intraperoxisomal peripheral membrane peroxin. *J Cell Biol* **137**, 1265-1278.
- Elgersma, Y., Kwast, L., van den Berg, M., Snyder, W. B., Distel, B., Subramani, S. & Tabak, H. F. (1997).** Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *Embo J* **16**, 7326-7341.
- Elgersma, Y., Elgersma-Hooisma, M., Wenzel, T., McCaffery, J. M., Farquhar, M. G. & Subramani, S. (1998).** A mobile PTS2 receptor for peroxisomal protein import in *Pichia pastoris*. *J Cell Biol* **140**, 807-820.
- Erdmann, R. & Blobel, G. (1996).** Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J Cell Biol* **135**, 111-121.
- Fahimi, H. D. (1969).** Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol* **43**, 275-288.
- Fang, Y., Morrell, J. C., Jones, J. M. & Gould, S. J. (2004).** PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* **164**, 863-875.

- Flavigny, E., Sanhaj, A., Aubourg, P. & Cartier, N. (1999).** Retroviral-mediated adrenoleukodystrophy-related gene transfer corrects very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts: implications for therapy. *FEBS Lett* **448**, 261-264.
- Fourcade, S., Savary, S., Albet, S. & other authors (2001).** Fibrate induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): promoter analysis and role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPAR α . *Eur J Biochem* **268**, 3490-3500.
- Fransen, M., Brees, C., Baumgart, E., Vanhooren, J. C., Baes, M., Mannaerts, G. P. & Van Veldhoven, P. P. (1995).** Identification and characterization of the putative human peroxisomal C-terminal targeting signal import receptor. *J Biol Chem* **270**, 7731-7736.
- Fransen, M., Wylin, T., Brees, C., Mannaerts, G. P. & Van Veldhoven, P. P. (2001).** Human pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences. *Mol Cell Biol* **21**, 4413-4424.
- Fransen, M., Vastiau, I., Brees, C., Brys, V., Mannaerts, G. P. & Van Veldhoven, P. P. (2005).** Analysis of human Pex19p's domain structure by pentapeptide scanning mutagenesis. *J Mol Biol* **346**, 1275-1286.
- Fraser, R. D. & Parry, D. A. (2008).** Molecular packing in the feather keratin filament. *J Struct Biol* **162**, 1-13.
- Fujiki, Y., Fowler, S., Shio, H., Hubbard, A. L. & Lazarow, P. B. (1982).** Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Cell Biol* **93**, 103-110.
- Furuki, S., Tamura, S., Matsumoto, N., Miyata, N., Moser, A., Moser, H. W. & Fujiki, Y. (2006).** Mutations in the peroxin Pex26p responsible for peroxisome biogenesis disorders of complementation group 8 impair its stability, peroxisomal localization, and interaction with the Pex1p x Pex6p complex. *J Biol Chem* **281**, 1317-1323.
- Gärtner, J. & Valle, D. (1993).** The 70 kDa peroxisomal membrane protein: an ATP-binding cassette transporter protein involved in peroxisome biogenesis. *Semin Cell Biol* **4**, 45-52.
- Gao, Y., Katyal, S., Lee, Y., Zhao, J., Reh, J. E., Russell, H. R. & McKinnon, P. J. (2011).** DNA ligase III is critical for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair. *Nature* **471**, 240-244.
- Geuze, H. J., Murk, J. L., Stroobants, A. K., Griffith, J. M., Kleijmeer, M. J., Koster, A. J., Verkleij, A. J., Distel, B. & Tabak, H. F. (2003).** Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* **14**, 2900-2907.
- Gietl, C. (1990).** Glyoxysomal malate dehydrogenase from watermelon is synthesized with an amino-terminal transit peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5773-5777.
- Girzalsky, W., Rehling, P., Stein, K., Kipper, J., Blank, L., Kunau, W. H. & Erdmann, R. (1999).** Involvement of Pex13p in Pex14p localization and peroxisomal targeting signal 2-dependent protein import into peroxisomes. *J Cell Biol* **144**, 1151-1162.
- Girzalsky, W., Saffian, D. & Erdmann, R. (2010).** Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 724-731.
- Glöckner, J. (2001).** Biogenese peroxisomaler Membranen: Funktion von PEX19 beim Transport peroxisomaler Membranproteine. *Institut für Experimentelle Genetik, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg*, 52-61.
- Gloeckner, C. J., Mayerhofer, P. U., Landgraf, P., Muntau, A. C., Holzinger, A., Gerber, J. K., Kammerer, S., Adamski, J. & Roscher, A. A. (2000).** Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 144-150.
- Gorgas, K. (1984).** Peroxisomes in sebaceous glands. V. Complex peroxisomes in the mouse preputial gland: serial sectioning and three-dimensional reconstruction studies. *Anat Embryol (Berl)* **169**, 261-270.
- Götte, K., Girzalsky, W., Linkert, M., Baumgart, E., Kammerer, S., Kunau, W. H. & Erdmann, R. (1998).** Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* **18**, 616-628.

- Gould, S., Raymond, G. & Vamecq, J. (1995).** Disorders of peroxisome biogenesis, in Scriver C., Beaudet A., Sly W., Valle D.: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, Mc Graw-Hill, 1995.
- Gould, S. G., Keller, G. A. & Subramani, S. (1987).** Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J Cell Biol* **105**, 2923-2931.
- Gould, S. J., Keller, G. A. & Subramani, S. (1988).** Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol* **107**, 897-905.
- Gould, S. J. & Valle, D. (2000).** Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet* **16**, 340-345.
- Guimaraes, C. P., Domingues, P., Aubourg, P., Fouquet, F., Pujol, A., Jimenez-Sanchez, G., Sa-Miranda, C. & Azevedo, J. E. (2004).** Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1689**, 235-243.
- Halbach, A., Lorenzen, S., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Erdmann, R. & Rottensteiner, H. (2005).** Function of the PEX19-binding site of human adrenoleukodystrophy protein as targeting motif in man and yeast. PMP targeting is evolutionarily conserved. *J Biol Chem* **280**, 21176-21182.
- Halbach, A., Landgraf, C., Lorenzen, S., Rosenkranz, K., Volkmer-Engert, R., Erdmann, R. & Rottensteiner, H. (2006).** Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J Cell Sci* **119**, 2508-2517.
- Hashimoto, T. (1982).** Individual peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Ann N Y Acad Sci* **386**, 5-12.
- Hensel, A., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2010).** Proteinimport in die peroxisomale Matrix - ein Prozess nimmt Formen an. *Biospektrum* **04.10**, 395-397.
- Hettema, E. H., Girzalsky, W., van Den Berg, M., Erdmann, R. & Distel, B. (2000).** *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *Embo J* **19**, 223-233.
- Higgins, C. F. (1992).** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.
- Hillebrand, M., Verrier, S. E., Ohlenbusch, A., Schafer, A., Soling, H. D., Wouters, F. S. & Gartner, J. (2007).** Live cell FRET microscopy: homo- and heterodimerization of two human peroxisomal ABC transporters, the adrenoleukodystrophy protein (ALDP, ABCD1) and PMP70 (ABCD3). *J Biol Chem* **282**, 26997-27005.
- Hoepfner, D., Schildknegt, D., Braakman, I., Philippsen, P. & Tabak, H. F. (2005).** Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**, 85-95.
- Höhfeld, J., Veenhuis, M. & Kunau, W. H. (1991).** PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *J Cell Biol* **114**, 1167-1178.
- Holzinger, A., Kammerer, S., Berger, J. & Roscher, A. A. (1997a).** cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP), a peroxisomal ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 261-264.
- Holzinger, A., Kammerer, S. & Roscher, A. A. (1997b).** Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 152-157.
- Holzinger, A., Mayerhofer, P., Berger, J., Lichtner, P., Kammerer, S. & Roscher, A. A. (1999).** Full length cDNA cloning, promoter sequence, and genomic organization of the human adrenoleukodystrophy related (ALDR) gene functionally redundant to the gene responsible for X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 436-442.
- Honda, R. & Yasuda, H. (1999).** Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* **18**, 22-27.
- Honsho, M., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N. & Fujiki, Y. (1998).** Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet* **63**, 1622-1630.

Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J. & other authors (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**, 362-365.

Imanaka, T., Shiina, Y., Takano, T., Hashimoto, T. & Osumi, T. (1996a). Insertion of the 70-kDa peroxisomal membrane protein into peroxisomal membranes in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **271**, 3706-3713.

Imanaka, T., Takano, T., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1996b). Sorting of the 70-kDa peroxisomal membrane protein into rat liver peroxisomes in vitro. *Ann N Y Acad Sci* **804**, 663-665.

Ito, M., Iidawa, S., Izuka, M., Haito, S., Segawa, H., Kuwahata, M., Ohkido, I., Ohno, H. & Miyamoto, K. (2004). Interaction of a farnesylated protein with renal type IIa Na/Pi co-transporter in response to parathyroid hormone and dietary phosphate. *Biochem J* **377**, 607-616.

Jansen, G. A., Ofman, R., Ferdinandusse, S. & other authors (1997). Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nat Genet* **17**, 190-193.

Jones, J. M., Morrell, J. C. & Gould, S. J. (2004). PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* **164**, 57-67.

Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1990). The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J Biol Chem* **265**, 4534-4540.

Kamijo, K., Kamijo, T., Ueno, I., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1992). Nucleotide sequence of the human 70 kDa peroxisomal membrane protein: a member of ATP-binding cassette transporters. *Biochim Biophys Acta* **1129**, 323-327.

Kamijo, T., Weber, J. D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8292-8297.

Kammerer, S., Arnold, N., Gutensohn, W., Mewes, H. W., Kunau, W. H., Hofler, G., Roscher, A. A. & Braun, A. (1997). Genomic organization and molecular characterization of a gene encoding HsPXF, a human peroxisomal farnesylated protein. *Genomics* **45**, 200-210.

Kammerer, S., Holzinger, A., Welsch, U. & Roscher, A. A. (1998). Cloning and characterization of the gene encoding the human peroxisomal assembly protein Pex3p. *FEBS Lett* **429**, 53-60.

Kashiwayama, Y., Morita, M., Kamijo, K. & Imanaka, T. (2002). Nucleotide-induced conformational changes of PMP70, an ATP binding cassette transporter on rat liver peroxisomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 1245-1251.

Kashiwayama, Y., Seki, M., Yasui, A., Murasaki, Y., Morita, M., Yamashita, Y., Sakaguchi, M., Tanaka, Y. & Imanaka, T. (2009). 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH2-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Exp Cell Res* **315**, 190-205.

Kemp, S., Wei, H. M., Lu, J. F., Braiterman, L. T., McGuinness, M. C., Moser, A. B., Watkins, P. A. & Smith, K. D. (1998). Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med* **4**, 1261-1268.

Klein, I., Sarkadi, B. & Varadi, A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 237-262.

Klopocki, E., Neumann, L. M., Tonnies, H., Ropers, H. H., Mundlos, S. & Ullmann, R. (2006).

Ulnar-mammary syndrome with dysmorphic facies and mental retardation caused by a novel 1.28 Mb deletion encompassing the TBX3 gene. *Eur J Hum Genet* **14**, 1274-1279.

Koller, A., Snyder, W. B., Faber, K. N., Wenzel, T. J., Rangell, L., Keller, G. A. & Subramani, S. (1999). Pex22p of *Pichia pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* **146**, 99-112.

Kreplak, L., Doucet, J., Dumas, P. & Briki, F. (2004). New aspects of the alpha-helix to beta-sheet transition in stretched hard alpha-keratin fibers. *Biophys J* **87**, 640-647.

- Krisans, S. K. (1992).** The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**, 358-364.
- Kunau, W. H., Buhne, S., de la Garza, M., Kionka, C., Mateblowski, M., Schultz-Borchard, U. & Thieringer, R. (1988).** Comparative enzymology of beta-oxidation. *Biochem Soc Trans* **16**, 418-420.
- Kunau, W. H. & Erdmann, R. (1998).** Peroxisome biogenesis: back to the endoplasmic reticulum? *Curr Biol* **8**, R299-302.
- Kunau, W. H. (2001).** Peroxisomes: the extended shuttle to the peroxisome matrix. *Curr Biol* **11**, R659-662.
- Kurbatova, E. M., Dutova, T. A. & Trotsenko Iu, A. (2005).** [Structural, functional and genetic aspects of peroxisome biogenesis]. *Genetika* **41**, 149-165.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakowicz, J. R., Castellano, F. N., Dattelbaum, J. D., Tolosa, L., Rao, G. & Gryczynski, I. (1998).** Low-frequency modulation sensors using nanosecond fluorophores. *Anal Chem* **70**, 5115-5121.
- Lam, S., Yoda, N. & Schekman, R. (2010).** A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21523-21528.
- Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J. & Hartig, A. (1998).** The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem* **273**, 33635-33643.
- Landgraf, P., Mayerhofer, P. U., Polanetz, R., Roscher, A. A. & Holzinger, A. (2003).** Targeting of the human adrenoleukodystrophy protein to the peroxisomal membrane by an internal region containing a highly conserved motif. *Eur J Cell Biol* **82**, 401-410.
- Langmann, T., Maurer, R., Zahn, A., Moehle, C., Probst, M., Stremmel, W. & Schmitz, G. (2003).** Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* **49**, 230-238.
- Lazarow, P. B. & Fujiki, Y. (1985).** Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 489-530.
- Lazarow, P. B. (1995).** Peroxisome structure, function, and biogenesis--human patients and yeast mutants show strikingly similar defects in peroxisome biogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**, 720-725.
- Lazo, O., Contreras, M., Hashmi, M., Stanley, W., Irazu, C. & Singh, I. (1988).** Peroxisomal lignoceroyl-CoA ligase deficiency in childhood adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7647-7651.
- Legakis, J. E. & Terlecky, S. R. (2001).** PTS2 protein import into mammalian peroxisomes. *Traffic* **2**, 252-260.
- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S. R. & Huang, C. C. (1997).** Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J Biol Chem* **272**, 28545-28549.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C. & Kain, S. R. (1998).** Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* **273**, 34970-34975.
- Liu, L. X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R. & Aubourg, P. (1999).** Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* **274**, 32738-32743.
- Lombard-Platet, G., Savary, S., Sarde, C. O., Mandel, J. L. & Chimini, G. (1996).** A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1265-1269.
- Maier, E. M., Mayerhofer, P. U., Asheuer, M. & other authors (2008).** X-linked adrenoleukodystrophy phenotype is independent of ABCD2 genotype. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 176-180.
- Manning, M. & Colon, W. (2004).** Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. *Biochemistry* **43**, 11248-11254.

- Marshall, C. J. (1993).** Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* **259**, 1865-1866.
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. & Kunau, W. H. (1994).** PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *Embo J* **13**, 4908-4918.
- Mast, F. D., Fagarasanu, A. & Rachubinski, R. (2010).** The peroxisomal protein importomer: a bunch of transients with expanding waistlines. *Nat Cell Biol* **12**, 203-205.
- Matsukawa, T., Asheuer, M., Takahashi, Y. & other authors (2010).** Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics* **12**, 41-50.
- Matsumoto, N., Tamura, S. & Fujiki, Y. (2003a).** The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat Cell Biol* **5**, 454-460.
- Matsumoto, N., Tamura, S., Furuki, S. & other authors (2003b).** Mutations in novel peroxin gene PEX26 that cause peroxisome-biogenesis disorders of complementation group 8 provide a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* **73**, 233-246.
- Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S. & other authors (1999).** Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2116-2121.
- Mayerhofer, P. U., Kattenfeld, T., Roscher, A. A. & Muntau, A. C. (2002).** Two splice variants of human PEX19 exhibit distinct functions in peroxisomal assembly. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 1180-1186.
- McGuinness, M. C., Lu, J. F., Zhang, H. P., Dong, G. X., Heinzer, A. K., Watkins, P. A., Powers, J. & Smith, K. D. (2003).** Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Cell Biol* **23**, 744-753.
- Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Kruger, V., Beck, S., Wagner, R. & Erdmann, R. (2010).** The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol* **12**, 273-277.
- Morin, J. G. & Hastings, J. W. (1971).** Energy transfer in a bioluminescent system. *J Cell Physiol* **77**, 313-318.
- Moser, H., Smith, K. & Moser, A. (1995).** X-Linked Adrenoleukodystrophy. In *The Metabolic And Molecular Bases Of Inherited Disease. vol 2* (ed C R Scriver, A L Beaudet, W S Sly and D Valle), 2325-2349.
- Moser, H., Smith, K., Watkins, P., Powers, J. & Moser, A. (2001).** X-linked Adrenoleukodystrophy. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. vol II* (ed C R Scriver, A L Beaudet, W S Sly and D Valle) pp 3257-3301 McGraw-Hill, New York.
- Mosser, J., Douar, A. M., Sarde, C. O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L. & Aubourg, P. (1993).** Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**, 726-730.
- Müller, W., Bovenberg, R., Groothuis, M., Kattevilder, F., Smaal, E., van der Voort, L. & Verkleij, A. (1992).** Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1116**, 210-213.
- Muntau, A. C., Holzinger, A., Mayerhofer, P. U., Gartner, J., Roscher, A. A. & Kammerer, S. (2000a).** The human PEX3 gene encoding a peroxisomal assembly protein: genomic organization, positional mapping, and mutation analysis in candidate phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 704-710.
- Muntau, A. C., Mayerhofer, P. U., Paton, B. C., Kammerer, S. & Roscher, A. A. (2000b).** Defective peroxisome membrane synthesis due to mutations in human PEX3 causes Zellweger syndrome, complementation group G. *Am J Hum Genet* **67**, 967-975.
- Muntau, A. C., Roscher, A. A., Kunau, W. H. & Dodt, G. (2003a).** Interaction of PEX3 and PEX19 visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Adv Exp Med Biol* **544**, 221-224.

- Muntau, A. C., Roscher, A. A., Kunau, W. H. & Dodt, G. (2003b).** The interaction between human PEX3 and PEX19 characterized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis. *Eur J Cell Biol* **82**, 333-342.
- Nashiro, C., Kashiwagi, A., Matsuzaki, T., Tamura, S. & Fujiki, Y. (2011).** Recruiting mechanism of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, to Pex26p on the peroxisomal membrane. *Traffic* **12**, 774-788.
- Netik, A., Forss-Petter, S., Holzinger, A., Molzer, B., Unterrainer, G. & Berger, J. (1999).** Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum Mol Genet* **8**, 907-913.
- Noguchi, T. & Takada, Y. (1978).** Peroxisomal localization of serine:pyruvate aminotransferase in human liver. *J Biol Chem* **253**, 7598-7600.
- Noguchi, T. & Takada, Y. (1979).** Peroxisomal localization of alanine: glyoxylate aminotransferase in human liver. *Arch Biochem Biophys* **196**, 645-647.
- Novikoff, A. B. & Shin, W. Y. (1964).** The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relation to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J Microscopie* **3**, 187-206.
- Novikoff, A. B. & Goldfischer, S. (1969).** Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J Histochem Cytochem* **17**, 675-680.
- Novikoff, A. B., Novikoff, P. M., Davis, C. & Quintana, N. (1972).** Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **20**, 1006-1023.
- Nunnari, J. & Walter, P. (1996).** Regulation of organelle biogenesis. *Cell* **84**, 389-394.
- Nuttall, J. M., Motley, A. & Hettema, E. H. (2011).** Peroxisome biogenesis: recent advances. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 421-426.
- Okumoto, K., Abe, I. & Fujiki, Y. (2000).** Molecular anatomy of the peroxin Pex12p: ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p. *J Biol Chem* **275**, 25700-25710.
- Oppendoes, F. R. & Borst, P. (1977).** Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* **80**, 360-364.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996).** Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N. & Fujiki, Y. (2000).** The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p.PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *J Biol Chem* **275**, 21703-21714.
- Parkinson, E. K., Munro, J., Steeghs, K., Morrison, V., Ireland, H., Forsyth, N., Fitzsimmons, S. & Bryce, S. (2000).** Replicative senescence as a barrier to human cancer. *Biochem Soc Trans* **28**, 226-233.
- Passreiter, M., Anton, M., Lay, D., Frank, R., Harter, C., Wieland, F. T., Gorgas, K. & Just, W. W. (1998).** Peroxisome biogenesis: involvement of ARF and coatamer. *J Cell Biol* **141**, 373-383.
- Pedersen, J. I. & Gustafsson, J. (1980).** Conversion of 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholestanoic acid into cholic acid by rat liver peroxisomes. *FEBS Lett* **121**, 345-348.
- Platta, H. W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2005).** Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol* **7**, 817-822.
- Platta, H. W., El Magraoui, F., Baumer, B. E., Schlee, D., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2009).** Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Mol Cell Biol* **29**, 5505-5516.
- Pujol, A., Hindelang, C., Callizot, N., Bartsch, U., Schachner, M. & Mandel, J. L. (2002).** Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet* **11**, 499-505.

- Pujol, A., Ferrer, I., Camps, C. & other authors (2004).** Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* **13**, 2997-3006.
- Purdue, P. E., Zhang, J. W., Skoneczny, M. & Lazarow, P. B. (1997).** Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nat Genet* **15**, 381-384.
- Rehling, P., Marzioch, M., Niesen, F., Wittke, E., Veenhuis, M. & Kunau, W. H. (1996).** The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the *PAS7* gene. *Embo J* **15**, 2901-2913.
- Rhodin, J. (1954).** Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed peroxisomal convoluted tubule cells of the mouse kidney. *Dissertation, Aktiebolaget Godvil, Stockholm*.
- Rottensteiner, H., Stein, K., Sonnenhol, E. & Erdmann, R. (2003).** Conserved function of pex11p and the novel pex25p and pex27p in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* **14**, 4316-4328.
- Rottensteiner, H., Kramer, A., Lorenzen, S., Stein, K., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R. & Erdmann, R. (2004).** Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol Biol Cell* **15**, 3406-3417.
- Rucktäschel, R., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2010).** Protein import machineries of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 892-900.
- Sacksteder, K. A., Jones, J. M., South, S. T., Li, X., Liu, Y. & Gould, S. J. (2000).** PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* **148**, 931-944.
- Schepers, L., Casteels, M., Vamecq, J., Parmentier, G., Van Veldhoven, P. P. & Mannaerts, G. P. (1988).** Beta-oxidation of the carboxyl side chain of prostaglandin E2 in rat liver peroxisomes and mitochondria. *J Biol Chem* **263**, 2724-2731.
- Schliebs, W. & Kunau, W. H. (2004).** Peroxisome membrane biogenesis: the stage is set. *Curr Biol* **14**, R397-399.
- Schneider, E. & Hunke, S. (1998).** ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 1-20.
- Schneider, E. (2000).** ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen. *Chemie in unserer Zeit* **2**: 90 – 98
- Schrader, M., King, S. J., Stroh, T. A. & Schroer, T. A. (2000).** Real time imaging reveals a peroxisomal reticulum in living cells. *J Cell Sci* **113** (Pt 20), 3663-3671.
- Schrader, M., Bonekamp, N. A. & Islinger, M. (2011).** Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta*.
- Shani, N., Sapag, A. & Valle, D. (1996).** Characterization and analysis of conserved motifs in a peroxisomal ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* **271**, 8725-8730.
- Shani, N., Jimenez-Sanchez, G., Steel, G., Dean, M. & Valle, D. (1997).** Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum Mol Genet* **6**, 1925-1931.
- Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Lee, K. H., Carrasco, D., Castrillon, D. H., Aguirre, A. J., Wu, E. A., Horner, J. W. & DePinho, R. A. (2001).** Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* **413**, 86-91.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.
- Simsek, D., Furda, A., Gao, Y. & other authors (2010).** Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature* **471**, 245-248.
- Small, G. M., Szabo, L. J. & Lazarow, P. B. (1988).** Acyl-CoA oxidase contains two targeting sequences each of which can mediate protein import into peroxisomes. *Embo J* **7**, 1167-1173.

- Snyder, W. B., Faber, K. N., Wenzel, T. J., Koller, A., Luers, G. H., Rangell, L., Keller, G. A. & Subramani, S. (1999).** Pex19p interacts with Pex3p and Pex10p and is essential for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* **10**, 1745-1761.
- Snyder, W. B., Koller, A., Choy, A. J. & Subramani, S. (2000).** The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* **149**, 1171-1178.
- Soukupova, M., Sprenger, C., Gorgas, K., Kunau, W. H. & Dodt, G. (1999).** Identification and characterization of the human peroxin PEX3. *Eur J Cell Biol* **78**, 357-374.
- South, S. T. & Gould, S. J. (1999).** Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol* **144**, 255-266.
- Steinberg, S., Chen, L., Wei, L., Moser, A., Moser, H., Cutting, G. & Braverman, N. (2004).** The PEX Gene Screen: molecular diagnosis of peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger syndrome spectrum. *Mol Genet Metab* **83**, 252-263.
- Steinberg, S. J., Wang, S. J., Kim, D. G., Mihalik, S. J. & Watkins, P. A. (1999).** Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 615-621.
- Subramani, S. (1998).** Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev* **78**, 171-188.
- Sugihara, T., Kaul, S. C., Kato, J., Reddel, R. R., Nomura, H. & Wadhwa, R. (2001).** Pex19p dampens the p19ARF-p53-p21WAF1 tumor suppressor pathway. *J Biol Chem* **276**, 18649-18652.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A. & Subramani, S. (1991).** A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* **10**, 3255-3262.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J. & Subramani, S. (1992).** Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett* **305**, 133-136.
- Tabak, H. F., Murk, J. L., Braakman, I. & Geuze, H. J. (2003).** Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum. *Traffic* **4**, 512-518.
- Tabak, H. F., Hoepfner, D., Zand, A., Geuze, H. J., Braakman, I. & Huynen, M. A. (2006).** Formation of peroxisomes: present and past. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1647-1654.
- Tamura, S., Yasutake, S., Matsumoto, N. & Fujiki, Y. (2006).** Dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p. *J Biol Chem* **281**, 27693-27704.
- Tao, W. & Levine, A. J. (1999).** P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6937-6941.
- Terlecky, S. R., Legakis, J. E., Hueni, S. E. & Subramani, S. (2001).** Quantitative analysis of peroxisomal protein import in vitro. *Exp Cell Res* **263**, 98-106.
- Thissen, J. A., Gross, J. M., Subramanian, K., Meyer, T. & Casey, P. J. (1997).** Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking. *J Biol Chem* **272**, 30362-30370.
- Thoms, S., Harms, I., Kalies, K. U. & Gartner, J. (2011).** Peroxisome Formation Requires the Endoplasmic Reticulum Channel Protein Sec61. *Traffic* **2012**.
- Thys, R. C., Lucas, F. S., Riffel, A., Heeb, P. & Brandelli, A. (2004).** Characterization of a protease of a feather-degrading Microbacterium species. *Lett Appl Microbiol* **39**, 181-186.
- Titorenko, V. I., Ogrydziak, D. M. & Rachubinski, R. A. (1997).** Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth, and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* **17**, 5210-5226.
- Titorenko, V. I. & Rachubinski, R. A. (1998).** Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* **18**, 2789-2803.

- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Troffer-Charlier, N., Doerflinger, N., Metzger, E., Fouquet, F., Mandel, J. L. & Aubourg, P. (1998).** Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines. *Eur J Cell Biol* **75**, 254-264.
- Urquhart, A. J., Kennedy, D., Gould, S. J. & Crane, D. I. (2000).** Interaction of Pex5p, the type 1 peroxisome targeting signal receptor, with the peroxisomal membrane proteins Pex14p and Pex13p. *J Biol Chem* **275**, 4127-4136.
- van der Zand, A., Braakman, I. & Tabak, H. F. (2010).** Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **21**, 2057-2065.
- van Roermund, C. W., Visser, W. F., Ijlst, L., van Cruchten, A., Boek, M., Kulik, W., Waterham, H. R. & Wanders, R. J. (2008).** The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *Faseb J* **22**, 4201-4208.
- Veenhuis, M. & Harder, W. (1988).** Microbodies in yeasts: structure, function and biogenesis. *Microbiol Sci* **5**, 347-351.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W. & other authors (2001).** The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Vignardet, C., Guillaume, Y. C., Michel, L., Friedrich, J. & Millet, J. (2001).** Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *Int J Pharm* **224**, 115-122.
- Wadhwa, R., Sugihara, T., Hasan, M. K., Taira, K., Reddel, R. R. & Kaul, S. C. (2002).** A major functional difference between the mouse and human ARF tumor suppressor proteins. *J Biol Chem* **277**, 36665-36670.
- Wanders, R. J., Heymans, H. S., Schutgens, R. B., Barth, P. G., van den Bosch, H. & Tager, J. M. (1988a).** Peroxisomal disorders in neurology. *J Neurol Sci* **88**, 1-39.
- Wanders, R. J., van Roermund, C. W., van Wijland, M. J., Schutgens, R. B., van den Bosch, H., Schram, A. W. & Tager, J. M. (1988b).** Direct demonstration that the deficient oxidation of very long chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy is due to an impaired ability of peroxisomes to activate very long chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* **153**, 618-624.
- Wanders, R. J., Heymans, H. S., Schutgens, R. B., Barth, P. G., van den Bosch, H. & Tager, J. M. (1988a).** Perxisomal Disorders in Neurology. *J Neurol Sci* **88**, 1-39.
- Wanders, R. J. & Waterham, H. R. (2005).** Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Genet* **67**, 107-133.
- Wanders, R. J., Ferdinandusse, S., Brites, P. & Kemp, S. (2010).** Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 272-280.
- Ward, W. W., Cody, C. W., Hart, R. C. & Cormier, M. J. (1980).** Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in Renilla and Aequorea green-fluorescent proteins. *Photochem Photobiol* **31**, 11-615.
- Wei, W., Hemmer, R. M. & Sedivy, J. M. (2001).** Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **21**, 6748-6757.
- Weller, S., Cajigas, I., Morrell, J., Obie, C., Steel, G., Gould, S. J. & Valle, D. (2005).** Alternative splicing suggests extended function of PEX26 in peroxisome biogenesis. *Am J Hum Genet* **76**, 987-1007.
- Wiemer, E. A., Nuttley, W. M., Bertolaet, B. L., Li, X., Francke, U., Wheelock, M. J., Anne, U. K., Johnson, K. R. & Subramani, S. (1995).** Human peroxisomal targeting signal-1 receptor restores peroxisomal protein import in cells from patients with fatal peroxisomal disorders. *J Cell Biol* **130**, 51-65.
- Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S. & Zhang, J. T. (2004a).** Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* **279**, 19781-19789.

Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N., Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**, 1246-1251.

Zhang, J. W. & Lazarow, P. B. (1996). Peb1p (Pas7p) is an intraperoxisomal receptor for the NH₂-terminal, type 2, peroxisomal targeting sequence of thiolase: Peb1p itself is targeted to peroxisomes by an NH₂-terminal peptide. *J Cell Biol* **132**, 325-334.

LEBENS LAUF

Name:	Florian Klaus Geiger
Geburtstag:	15.10.1976
Geburtsort:	Erding
Familienstand:	seit 20.03.2010 verheiratet, am 10.07.2011 kam mein Sohn Johannes zur Welt
Anschrift:	Am Angerberg 21a, 83620 Feldkirchen-Westerham
1983 - 1987	Grundschule Feldkirchen
1987 - 1997	Gymnasium Bad Aibling
27.06.1997	Abitur
01.09.1997 - 30.06.1998	Grundwehrdienst als Stabsdienstsoldat 5. Gebirgspionierbatallion 8 in Brannenburg
1999 - 2006	an der LMU München immatrikuliert Fach: Zahnmedizin
30.01.2006	Zahnärztliche Prüfung
01.04.2006 - 31.10.2008	Assistenzzeit in der Praxis Dr. Wyrwoll in Grafing
01.11.2008-31.12.2011	Zahnarzt in der Praxis Dr. Geiger in Feldkirchen-Westerham
seit 01.01.2012	in eigener Praxis tätig

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein, Direktor des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals für die Möglichkeit an seiner Klinik promovieren zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Ania Muntau für das Überlassen dieses interessanten Themas, sowie für die Unterstützung und den Zuspruch während dieser Arbeit.

Ich danke ganz besonders meinem Betreuer Herrn Dr. Peter Mayerhofer, der mich in die Grundlagen der molekulargenetischen Arbeitsmethoden einwies, und auch nach seinem Weggang in die USA kompetent weiter betreute und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Amelie Lotz-Havla für die Unterstützung während der Zeit des Zusammenschreibens bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Muntau möchte ich für das immer angenehme und fröhliche Arbeitsklima danken.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Holzinger für die Überlassung der cDNAs für die peroxisomalen ABC-Transporter und Herrn Dr. Stefan Kammerer für die Überlassung der cDNA von PEX19 und PEX3.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, Großeltern und meiner Frau Regina, die mich auf dem langen Weg des Studiums und der Doktorarbeit ständig unterstützt und die ganze Zeit hinter mir gestanden haben.